

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Mise au point d'un damier prototype pour étudier l'expression de cellules monocytaires humaines en conditions pro-inflammatoires et pro-atherogènes

Toffoli, Sébastien

Award date:
2002

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**MISE AU POINT D'UN DAMIER PROTOTYPE POUR ETUDIER
L'EXPRESSION DE CELLULES MONOCYTAIRES HUMAINES EN
CONDITIONS PRO-INFLAMMATOIRES ET PRO-ATHEROGENES**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Sébastien TOFFOLI

Juin 2002

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18- Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

MISE AU POINT D'UN DAMIER PROTOTYPE POUR ETUDIER L'EXPRESSION DE CELLULES MONOCYTAIRES HUMAINES EN CONDITIONS PRO-INFLAMMATOIRES ET PRO-ATHEROGENES

TOFFOLI Sébastien

Résumé

L'athérosclérose, maladie caractérisée par un épaissement local de la paroi des artères musculaires et élastiques, est responsable de plus de 50% des décès dans le monde occidental. Les étapes initiales de cette pathologie sont caractérisées par un contexte inflammatoire dans lequel le monocyte joue un rôle central. Mais les études de son implication dans les étapes précoces de l'athérosclérose restent peu nombreuses. C'est pour ces raisons, que nous avons voulu étudier l'expression au niveau de l'ARN messager, de monocytes soumis à des conditions pro-inflammatoires ou pro-athérogènes, et ce au moyen d'un microdamier à ADN prototype. Celui-ci est construit par une amplification PCR de fragments de séquences de gènes d'intérêt. Ces produits PCR sont spottés sur des lames de verre fonctionnalisées, afin de servir de sondes de capture pour des ADN complémentaires, obtenus par transcription inverse d'ARN messagers extraits de monocytes de la lignée cellulaire THP-1, stimulés ou non avec des lipopolysaccharides. En hybridant ces ADN complémentaires et après révélation en fluorescence et traitement statistique des résultats, nous observons bien des variations d'expression de gènes entre cellules stimulées et cellules contrôles. La caractérisation des patterns d'expression en conditions inflammatoires, puis en conditions pro-athérogènes à l'aide d'un damier plus élaboré, devrait nous permettre de mieux comprendre les étapes précoces de l'athérosclérose, mais aussi de détecter des anomalies monocytaires chez les patients hypercholestérolémiques avant même que des lésions athéromateuses ne soient apparentes.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2002

Promoteur: M. Raes

Remerciements

Je remercie tout d'abord le Professeur Martine Raes, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et intégré à son équipe, ainsi que pour le temps qu'elle a consacré à la correction de ce travail.

Merci à Isabelle, pour m'avoir guidé tout au long de ces trois mois, de m'avoir toujours soutenu, mais également pour son éternelle bonne humeur et son dynamisme. Merci également pour les corrections apportées à ce travail.

Je remercie également Sofia pour ses conseils et pour la relecture de ce mémoire.

Merci aussi à Martine et Aurélie de l'équipe « Athérosclérose ».

Merci à Françoise, Murielle, Anne-France, Véronique, Eric, Jean-Pierre et tous les membres de l'équipe AAT, pour les clones et les amorces.

Merci à Stéphane pour le coup de main.

Je remercie l'ensemble des mémorants : Ludo, Marie, Aline, Christophe (Pappy), Marina, Céline, Valery, Sophie, Catherine, Cyndi, Delphine, Julien, Manu, Maude, Katy, Christelle (bouboule aux mains d'argent), pour tous les bons moments passés ensemble. Merci à tous.

Sébastien

LISTE DES ABREVIATIONS

ACAT	Acyl CoA:Cholestérol AcylTransférase
ADN	AcideDéoxyriboNucléique
ADNc	AcideDéoxyriboNucléique complémentaire
Apo A-I	Apolipoprotéine A-I
Apo A-II	Apolipoprotéine A-II
Apo A-IV	Apolipoprotéine A-IV
Apo C-II	Apolipoprotéine C-II
ApoB100	Apolipoprotéine B 100
ApoC-II	Apolipoprotéine C-II
ApoE	Apolipoprotéine E
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
CAM	Molécule d'Adhérence Cellulaire
CCR2	CC-Chémokine récepteur 2
CCR2A	Chémokine (C-C motif) Récepteur 2 isoforme A
CCR2B	Chémokine (C-C motif) Récepteur 2 isoforme B
CD 36	Antigène CD36
COX-2	Cyclooxygénase 2
DTT	Dithiotréitol
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ESL-1	Ligands Sélectine-E-1
GAPDH	GlycérAldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase
GlyCam 1	Glycosylat dependent CAM
HDL	High Density Lipoprotein
HMG-CoA réductase	3-Hydroxy-3méthylglutaryl coenzyme A réductase
HRP	Horse-Radish Peroxydase
IAP	Integrin-Associated Protein
ICAM2	Intracellular adhesion molecule-2
IDL	Intermediate Density Lipoprotein
IFN	Interferon
IL-1	Interleukine 1
IL-8	Interleukine 8
LCAT	Lécitine-Cholestérol AcylTransférase
LDL	Low Density Lipoprotein
LFA-1	Leukocyte Function Associated molecule 1
LPL	LipoProtéine Lipase
LPS	Lipopolysaccharide
Mad Cam	Mucosal addresin Cam
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
M-CSF	Macrophage Colony Stimulating Factor

MmLDL	Minimally modified Low Density Lipoprotein
ox-LDL	oxidized Low Density Lipoprotein
PCR	Polimerase Chain Reaction
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PECAM	Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule
PLA2	Phospholipase A2
PPAR alpha	Peroxisome Proliferator Activated Receptor alpha
PPAR gamma	Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma
PSGL-1	P-Selectin glycoprotein Ligands
RZPD	RessourcenZentrum/Primäre Datenbank
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SR-A	Scavenger Receptor A
THBD	THromBomoDuline
TNF	Tumor Necrosis Factor
VLDL	Very Low Density Lipoprotein

Table des matières

I. INTRODUCTION

1. <u>Athérosclérose</u>	1
1.1. <u>Structure des artères</u>	1
1.2. <u>Athérosclérose : définition et causes principales</u>	2
1.3. <u>Les lipoprotéines : caractéristiques, transport et métabolisme</u>	3
1.3.2. <u>Les VLDL, IDL et LDL</u>	4
1.3.3. <u>Les HDL</u>	5
1.4. <u>Implication des lipoprotéines dans l'athérosclérose</u>	5
1.5. <u>Mise en place et évolution des lésions avec l'implication des monocytes</u>	7
1.5. <u>Les cytokines</u>	10
2. <u>Analyse comparative d'expression génique : quelques approches</u>	12
2.1. <u>Au niveau des protéines</u>	12
2.1.1. <u>Test ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)</u>	12
2.1.2. <u>Le Western Blot (Immunoblot)</u>	13
2.1.3. <u>Electrophorèse à deux dimensions et Protéomique</u>	13
2.2. <u>Au niveau des ARN messagers</u>	14
2.2.1. <u>Techniques sans <i>a priori</i></u>	14
2.2.1.1. <u>Differential Display</u>	14
2.2.1.2. <u>Damiers à haute densité</u>	15
2.2.2. <u>Technique avec <i>a priori</i></u>	16
2.2.2.1. <u>Northern blot</u>	16
2.2.2.2. <u>PCR en temps réel</u>	16
2.2.2.3. <u>Le microdamier à ADN</u>	17
3. <u>Choix des gènes</u>	18
4. <u>Objectif du mémoire</u>	20

II. MATERIELS ET MÉTHODES

1. <u>Recherche de clones</u>	21
1.1. <u>Principe</u>	21
1.2. <u>Méthode</u>	21

2. <u>CULTURE BACTERIENNE</u>	23
2.1. <u>Culture sur milieu solide Luria Bertani (LB)</u>	23
2.1.1. <u>Matériel</u>	23
2.1.2. <u>Méthode</u>	24
a) <u>Préparation du milieu Luria Bertani</u>	24
2.2. <u>Culture en milieu liquide</u>	24
2.2.1. <u>Matériel</u>	25
2.2.2. <u>Méthode</u>	25
a) <u>Préparation du milieu Luria Bertani</u>	25
b) <u>Préparation de la culture liquide</u>	25
3. <u>EXTRACTION D'ADN PLASMIDIQUE (mini-préparation d'ADN plasmidique)</u>	26
3.1. <u>Matériel</u>	26
3.2. <u>Méthode</u>	26
3.2.1. <u>Préparation du tampon P1</u>	26
3.2.2. <u>Extraction</u>	26
4. <u>PCR pour la production d'ADN de capture</u>	27
4.1. <u>Principe</u>	27
4.2. <u>Choix des amorces</u>	28
4.3. <u>Matériel</u>	28
4.4. <u>Méthode</u>	29
5. <u>ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE</u>	29
5.1. <u>Principe</u>	29
5.2. <u>Matériel</u>	30
5.3. <u>Méthode</u>	30
a) <u>Préparation du gel à 2% d'agarose</u>	30
b) <u>Préparation des échantillons</u>	31
c) <u>Electrophorèse</u>	31
6. <u>PURIFICATION DE PRODUITS PCR</u>	32
6.1. <u>Matériel</u>	32
6.2. <u>Méthode</u>	32
7. <u>CONCENTRATION DE PRODUITS PCR</u>	33
7.1. <u>Principe</u>	33
7.2. <u>Matériel</u>	33
7.3. <u>Méthode</u>	33
8. <u>QUANTIFICATION D'ADN DOUBLE BRIN (ds ADN)</u>	34
8.1. <u>Matériel</u>	34
8.2. <u>Méthode</u>	34
a) <u>Préparation du tampon TE1X</u>	34
b) <u>Préparation de la solution de picogreen</u>	34
c) <u>Préparation des échantillons pour la réalisation de la courbe standard</u>	35
d) <u>Préparation des échantillons à quantifier (en triple)</u>	35
e) <u>Préparation pour la quantification</u>	35

9.	<u>SPOTTING</u>	36
9.1.	<u>Principe</u>	36
9.2.	<u>Matériel</u>	36
9.3.	<u>Méthode</u>	36
	a) <u>Préparation des échantillons</u>	36
	b) <u>Spotting</u>	37
10.	<u>LAVAGE DES LAMES</u>	37
10.1.	<u>Principe</u>	37
10.2.	<u>Matériel</u>	37
10.3.	<u>Méthode</u>	38
	a) <u>Préparation des solutions</u>	38
	b) <u>Lavages</u>	38
11.	<u>CULTURE CELLULAIRE</u>	38
11.1.	<u>Culture des cellules THP-1</u>	38
11.2.	<u>Matériel</u>	39
11.3.	<u>Méthode</u>	39
12.	<u>COMPTAGE CELLULAIRE</u>	40
12.1.	<u>Matériel</u>	40
12.2.	<u>Méthode</u>	40
13.	<u>STIMULATION DES THP-1</u>	40
13.1.	<u>Matériel</u>	40
13.2.	<u>Méthode</u>	41
14.	<u>EXTRACTION D'ARN MESSAGER DE CELLULES MONOCYTAIRES</u>	41
	<u>THP-1</u>	41
14.1.	<u>Principe</u>	41
14.2.	<u>Matériel</u>	41
14.3.	<u>Méthode</u>	42
	a) <u>Préparation des échantillons</u>	42
	b) <u>Lyse des cellules</u>	43
	c) <u>Lavages</u>	43
	c) <u>Elution et précipitation de l'ARN messager</u>	44
15.	<u>TRANSCRIPTION INVERSE (RT)</u>	45
15.1.	<u>Principe</u>	45
15.2.	<u>Matériel</u>	45
15.3.	<u>Méthode</u>	46
	a) <u>Préparation du MIX d'ARNm</u>	46
	b) <u>Préparation du MIX de dNTP10X</u>	46
	c) <u>Préparation du mix de réaction</u>	46
	d) <u>Transcription inverse</u>	46
16.	<u>HYBRIDATION D'ADN CIBLE BIOTINYLÉ</u>	47
16.1.	<u>Principe</u>	47

16.2. <u>Matériel</u>	47
16.3. <u>Méthode</u>	48
16.3.1. <u>Hybridation</u>	48
16.3.2. <u>Lavages post-hybridation</u>	48
17. <u>DÉTECTION DES ADN CIBLES</u>	49
17.1. <u>Matériel</u>	49
17.2. <u>Méthode</u>	49
18. <u>Quantification</u>	50
18.1. <u>Matériel</u>	50
18.2. <u>Méthode</u>	50
18.2.1. <u>Quantification</u>	50
18.2.2. <u>Traitement des données</u>	51
18.2.3. <u>Détermination de la variation d'expression de gène d'une situation test par rapport à.....</u>	51
<u>un contrôle</u>	51

III. RÉSULTATS ET CONCLUSIONS

I. <u>Première Partie : Elaboration du microdamier</u>	53
1. <u>Recherche de clones</u>	53
2. <u>Préparation des plasmides</u>	54
2.1. <u>Culture des clones sur milieu solide Luria Bertani</u>	54
2.2. <u>Culture bactérienne en milieu liquide</u>	54
2.3. <u>Extraction d'ADN plasmidique</u>	54
2.4. <u>Séquençage</u>	54
3. <u>Amplification des ADN cibles par PCR</u>	55
3.1. <u>Définition des amorces</u>	55
3.2. <u>PCR « tests »</u>	55
3.3. <u>PCR de production</u>	56
3.4. <u>Production des cibles biotinylées</u>	56
3.5. <u>Purification des produits PCR</u>	56
3.6. <u>Concentration des produits PCR</u>	57
3.7. <u>Quantification des produits PCR</u>	57
4. <u>Spotting</u>	57
4.1. <u>Design du damier</u>	57
4.2. <u>Spotting</u>	59
5. <u>Tests de spécificité</u>	59

II. <u>Utilisation du microdamier</u>	61
1. <u>Stimulation des cellules THP-1</u>	61
2. <u>Extraction d'ARN messager</u>	61
3. <u>Transcription inverse</u>	62
4. <u>Hybridation d'ADN cibles biotinylés</u>	63
5. <u>Détection des ADN complémentaires</u>	63
6. <u>Quantification</u>	65
7. <u>Effets du LPS sur l'expression des gènes dans les cellules THP-1. Analyse avec le microdamier</u>	65
7.1. <u>Effet du LPS sur l'expression de gènes dans des cellules THP-1 stimulées pendant 24 heures par rapport à des THP-1 contrôles (Expérience1)</u>	65
7.2. <u>Effet du LPS sur l'expression d'expression de gènes dans des cellules THP-1 stimulées entre 6 et 24 heures (Expérience 2) par rapport à des THP-1 contrôles</u>	66
7.3. <u>Discussion</u>	67

IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 71

V. BIBLIOGRAPHIE.....77

Errata

- Les indications des poids moléculaires ont été corrigées pour les figures III.3 et III.4.

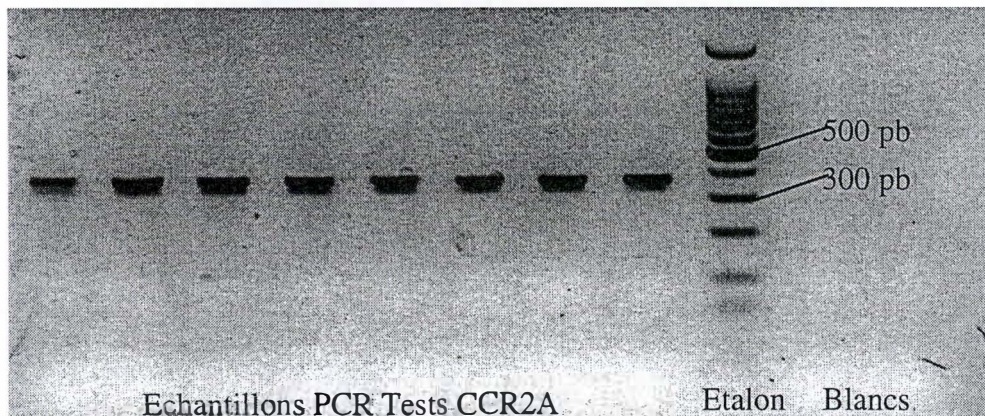


Figure III.3 : Gel d'agarose (2%) sur lequel huit échantillons PCR Tests CCR2A ainsi que les blancs qui leur sont associés, ont été déposés pour migration. Un marqueur de poids moléculaire (Etalon) permet d'évaluer la taille des fragments d'ADN obtenus par PCR. 10 μ l de produits PCR auxquels étaient associés 2 μ l de bleu de chargement ont été déposés par puits (Tests et Blancs). Pour l'étalon, on dépose 10 μ l de marqueur de poids moléculaire. L'ensemble des produits déposés sur le gel a migré pendant une heure à 120 V. Pour chaque échantillon PCR tests CCR2, on a obtenu une bande d'environ 400 pb correspondant à la bande attendue. La seconde, de taille à peine inférieure, correspond à la bande parasite. Au niveau des blancs, aucune bande n'est observable. Il s'agit d'une image en « négatif » du gel.

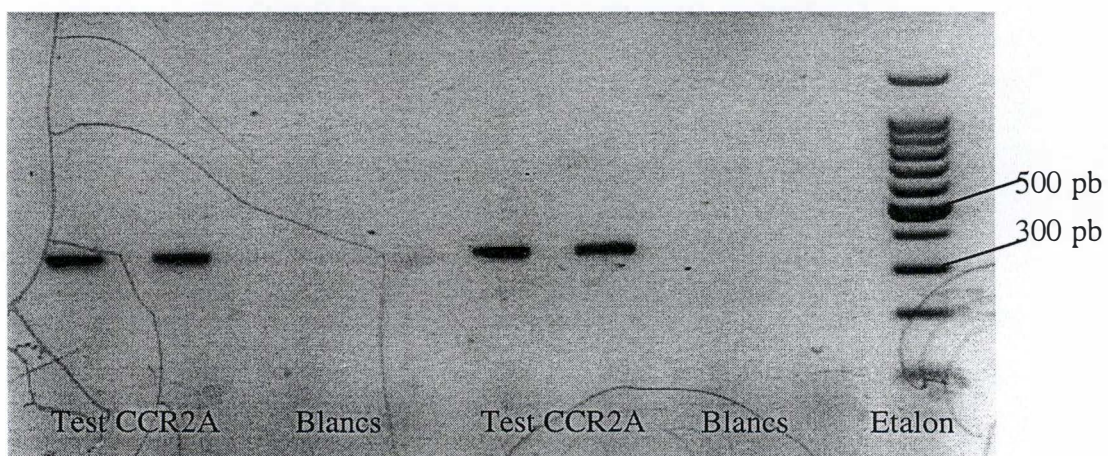


Figure III.4 : Gel d'agarose (2%) sur lequel huit échantillons PCR Tests CCR2A ainsi que les blancs qui leur sont associés, ont été déposés pour migration. Un marqueur de poids moléculaire (Etalon) permet d'évaluer la taille des fragments d'ADN obtenus par PCR. 10 μ l de produits PCR auxquels étaient associés 2 μ l de bleu de chargement ont été déposés par puits (Tests et Blancs). Pour l'étalon, on dépose 10 μ l de marqueur de poids moléculaire. L'ensemble des produits déposés sur le gel a migré pendant une heure à 120 V. Aucune bande secondaire parasite n'est observable. Au niveau des blancs, aucune bande n'est observable au niveau des tests CCR2A. Il s'agit d'une image en « négatif » du gel.

- Les molécules leukocytaires ont été soulignées

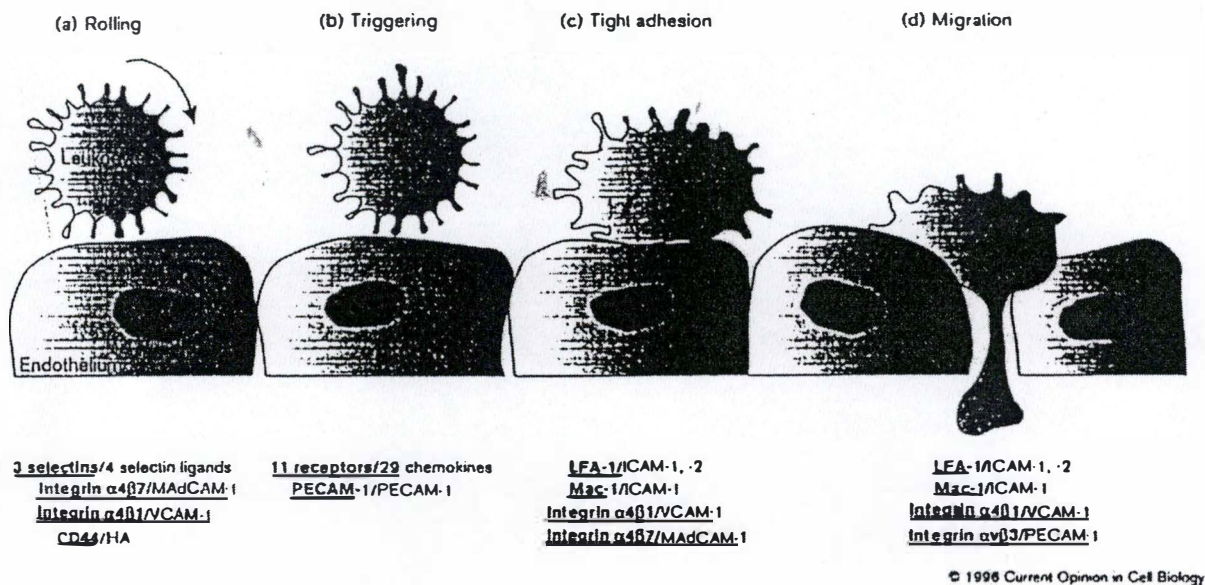


Figure I.9 : Le passage des leukocytes du sang au tissu nécessite l'interaction avec l'endothélium vasculaire. Ceci se déroule en quatre étapes: (a) « rolling » le long de l'endothélium vasculaire; (b) signaux de « triggering » qui activent les intégrines leukocytaires; (c) adhérence ferme à l'endothélium vasculaire; (d) migration transendothéliale. Chaque étape est contrôlée par différentes molécules d'adhérence; ces molécules sont indiquées au bas du diagramme. Les molécules leukocytaires sont soulignées, les molécules endothéliales ne sont pas soulignées (Dunon et *al.*, 1996).

I. Introduction

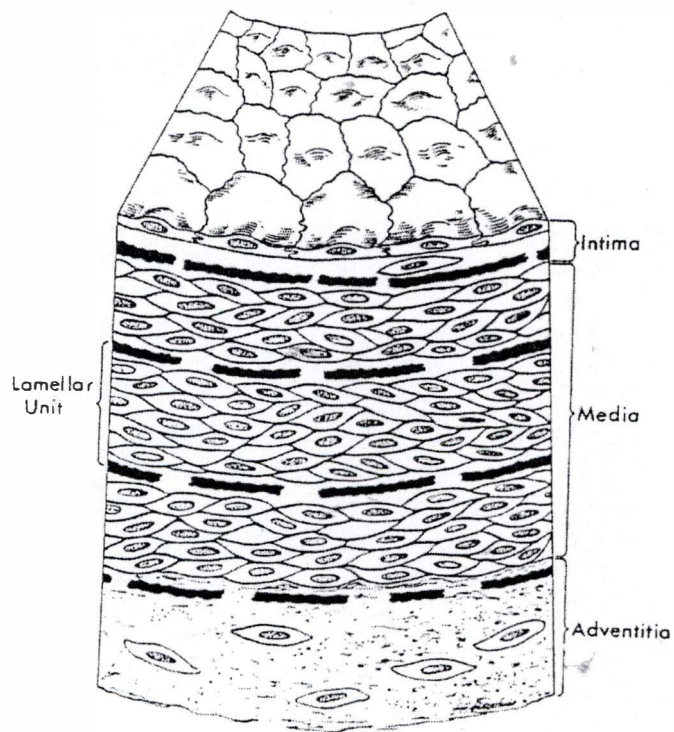


Figure I.1 : Structure d'une artère élastique normale (Ross et *al.*, 1976)

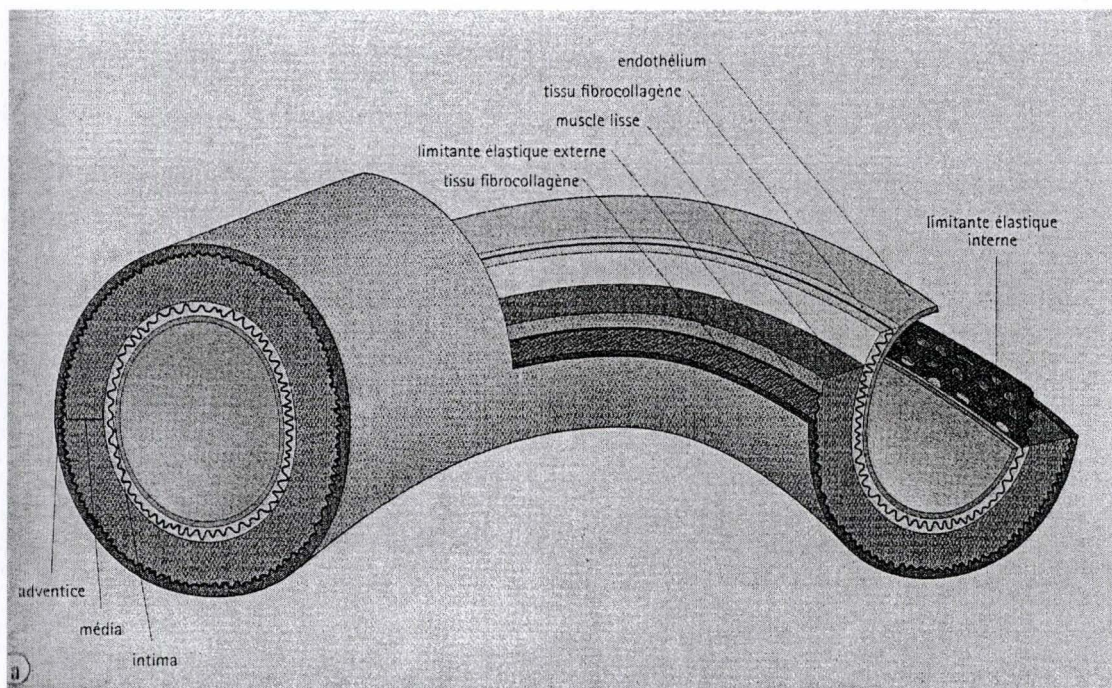


Figure I.2 : Artère musculaire (Stevens et *al.*, 1997)

1. Athérosclérose

L'athérosclérose étant caractérisée par des lésions, les athéromes, affectant les artères, nous rappelons rapidement la structure de celles-ci.

1.1. Structure des artères

L'athérosclérose, cas particulier d'artériosclérose (durcissement des artères) (Collins, 1996) est une pathologie touchant les artères de gros calibre. Parmi celles-ci, on distingue les artères élastiques (Figure I.1) comprenant les gros vaisseaux tel l'aorte, le tronc inominé, la carotide commune, les sous-clavières ainsi que la plupart des vaisseaux artériels pulmonaires ; et les artères musculaires (Figure I.2) qui sont des ramifications du tronc artériel comme par exemple les artères radiales, fémorales, coronaires et cérébrales (Burkitt *et al.*, 1995).

Les artères musculaires et élastiques, dites normales, sont constituées de trois couches morphologiques distinctes : l'intima, la média et l'adventice .

L'intima est une couche fine située dans la partie luminale de la paroi artérielle. Elle est constituée d'une monocouche de cellules endothéliales et de leur membrane basale. Celle-ci repose sur une fine couche subendothéliale, composée de tissu conjonctif avec une matrice extracellulaire constituée de protéoglycans et de collagène. L'intima est délimitée par une limitante élastique interne fenestrée (Burkitt *et al.*, 1995; Ross *et al.*, 1976).

L'intima est suivie de la média qui constitue la partie centrale et la plus développée de la paroi artérielle. Elle est formée de cellules musculaires lisses orientées perpendiculairement et de manière circulaire par rapport à l'axe du vaisseau et entourées de fibres d'élastine, de collagène et de protéoglycans. Leurs contractions et relâchements permettent la modulation du flux sanguin par modification du diamètre de la lumière artérielle. Elle est séparée , enfin, de l'adventice sous-jacente par une limitante élastique externe (Burkitt *et al.*, 1995; Ross *et al.*, 1976).

L'adventice est la couche la plus extérieure et la plus réduite chez les artères. Elle est constituée majoritairement de tissu conjonctif et présente des petits vaisseaux sanguins, les vasa vasorum, qui envoient des rameaux traversant la média pour lui fournir du sang.

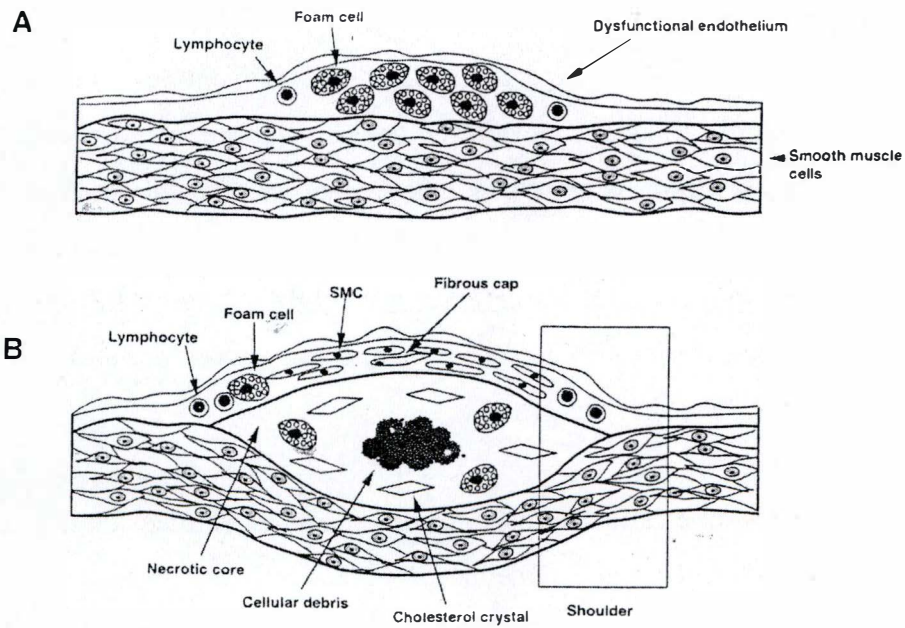


Figure I.3 : Lésions athérosclérotiques. A : Composants de la strie lipidique. Il y a une accumulation subendothéliale de cellules spumeuses. B : Architecture d'une plaque fibreuse. (Collins et *al.*, 1996)

Il y chemine également des nerfs du système nerveux autonome innervant le muscle lisse de la media, ainsi que des vaisseaux lymphatiques (Burkitt *et al.*, 1995; Ross *et al.*, 1976).

Les artères élastiques présentent une structure globalement similaire aux artères musculaires, mais elles se différencient de celles-ci par leur média.

La média d'une artère élastique est constituée d'unités lamellaires de cellules musculaires lisses séparées les unes des autres par des limitantes élastiques fenestrées, donnant à l'artère une plus grande résistance à la pression systolique. Mais cette élasticité assure également le maintien d'une pression sanguine suffisante, pendant la diastole.

1.2. Athérosclérose : définition et causes principales

L'athérosclérose est caractérisée, initialement par une altération dégénérative de l'intima avec des dépôts lipidiques intrapariétaux (Lusis, 2000) (Figure I.3) . Ces lésions peuvent devenir fibreuses et former des plaques calcifiées rétrécissant, voire même obstruant la lumière artérielle (Collins, 1996). Signalons que les lésions les plus dangereuses, ne sont pas nécessairement des lésions très obturantes, souvent stables, mais plutôt des lésions moins évoluées et instables. Ces dernières peuvent se fissurer et être à l'origine d'une hémorragie et d'un caillot, avec des conséquences plus ou moins graves pour le patient. Cette pathologie et ses complications constituent ainsi un processus pathologique qui est à la base de la plupart des cas de maladies cardiaques coronariennes, cérébrovasculaires, aortiques, ainsi que de maladies vasculaires périphériques (Sternby *et al.*, 1999). Elle est la cause de plus de 50% de la mortalité dans les sociétés occidentales (Lusis, 2000) et devient un problème émergent dans les pays en voie de développement (Sternby *et al.*, 1999). L'athérosclérose est le résultat d'un processus qui s'étend sur toute une vie. Les étapes initiales se déroulent chez les personnes jeunes, parfois même dès l'enfance, mais restent silencieuses et sans symptômes. Les premières manifestations cliniques apparaissent à un âge moyen (40-45 ans) ou plus tardivement et principalement sous la forme d'infarctus du myocarde, d'anévrisme aortique ou encore d'hypertension réno-vasculaire (World Health Organization, 1982).

Les études épidémiologiques menées depuis plus de 50 ans, ont révélé de nombreux facteurs de risques pour l'athérosclérose. Ceux-ci peuvent être regroupés en deux

Factors with a strong genetic component	
Elevated levels of LDL/M,DL	Associations demonstrated in epidemiological studies and supported by studies of genetic disorders and animal models. Clinical trials have shown benefits of cholesterol reduction ⁵⁴ .
Reduced levels of HDL	Associations demonstrated by numerous epidemiological studies and supported by studies of genetic diseases and animal models ⁵⁶ .
Elevated levels of lipoprotein(a)	Associations observed in many, but not all, epidemiological studies. Animal studies have been contradictory ⁵⁶ .
Elevated blood pressure	Associations observed in epidemiological studies. Clinical trials have demonstrated benefits of blood pressure reduction, with particularly strong effects on stroke ^{54,60} .
Elevated levels of homocysteine	Associations have been observed in epidemiological studies, and homocystinuria results in severe occlusive vascular disease ⁵⁶ .
Family history	When all known risk factors are controlled for, family history remains a very significant independent factor ⁴ .
Diabetes and obesity	Associations observed in epidemiological studies and in studies with animal models ⁵⁴ .
Elevated levels of haemostatic factors	Significant independent associations have been observed with elevated levels of fibrinogen, plasminogen activator inhibitor type 1 and platelet reactivity ⁵⁴ .
Depression and other behavioural traits	Associations observed in several population studies ⁵¹ .
Gender (male)	Below age 60, men develop CHD at more than twice the rate of women ⁵⁴ .
Systemic inflammation	Elevated levels of inflammatory molecules such as C-reactive protein are associated with CHD, as are inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis ⁵² .
Metabolic syndrome	This cluster of metabolic disturbances, with insulin resistance as a central feature, is strongly associated with CHD ⁵ .
Environmental factors	
High-fat diet	Population migration and epidemiological studies indicate strong associations with lifestyle, and diet appears to be the most significant factor. High-fat, high-cholesterol diets are usually required for development of atherosclerosis in experimental animals ⁵⁴ .
Smoking	Strong associations observed in numerous epidemiological studies. Clinical trials have demonstrated the benefit of stopping smoking ⁴ .
Low antioxidant levels	Results of clinical trials with antioxidants have not been conclusive. Fat-soluble antioxidants protect against atherosclerosis in experimental animals, however ⁶⁰ .
Lack of exercise	Significant independent associations with CHD ⁵⁴ .
Infectious agents	Epidemiological studies provide suggestive evidence for associations with various infectious agents, such as <i>Chlamydia pneumoniae</i> . Preliminary animal studies support the relationship ⁵⁴ .

Tableau I.1: Tableau récapitulant les principaux facteurs environnementaux et génétiques associés à l'athérosclérose et aux maladies cardiaques coronariennes (Lusis, 2000)

TABLEAU 11-6. CARACTÉRISTIQUES DES PRINCIPALES CLASSES DE LIPOPROTÉINES DU PLASMA HUMAIN

	Chylomicrons	VLDL	IDL	LDL	HDL
Densité (g·cm ⁻³)	<0.95	<1,006	1,006-1,019	1,019-1,063	1,063-1,210
Diamètre de la particule (Å)	750-12000	300-800	250-350	180-250	50-120
Masse de la particule (kDa)	400.000	10-80.000	5-10.000	2300	175-360
Protéine % ^a	1,5-2,5	5-10	15-20	20-25	40-55
Phospholipides % ^a	7-9	15-20	22	15-20	20-35
Cholestérol libre % ^a	1-3	5-10	8	7-10	3-4
Triacylglycérols % ^b	84-89	50-65	22	7-10	3-5
Esters de cholestérol % ^b	3-5	10-15	30	35-40	12
Apolipoprotéines majeures	A-I, A-II, B-48, C- I, C-II, C-III, E	B-100, C-I, C-II, C-III, E	B-100, CIII, E	B-100	A-I, A-II, C-I, C-II, C-III, D, E

^a Constituants de surface

^b Lipides centraux

Tableau I.2 : Caractéristiques des principales classes de lipoprotéines du plasma humain. VLDL : Very Low Density Lipoprotein, IDL : Intermediary Density lipoprotein, LDL : Low Density Lipoprotein, HDL : High Density Lipoprotein.(Voet et al., 1998).

Introduction

grandes catégories : les facteurs à fortes composantes génétiques et les facteurs environnementaux (Lusis, 2000) (Tableau I.1). Les facteurs de risques génétiques sont liés à des gènes bien identifiés, mais ils sont également modulés par les facteurs environnementaux pouvant influencer sur l'expression de ces gènes en plus de s'ajouter à leur effet. S'il existe des réactions croisées entre facteurs de groupes différents, il peut également y en avoir entre facteurs d'un même groupe et les facteurs de risques combinés ne sont pas simplement additifs. Ainsi, par exemple, l'effet de l'hypertension sur les maladies cardiovasculaires est considérablement amplifié si le taux de cholestérol est élevé (Lusis *et al.*, 1998) ou encore un niveau faible en anti-oxydant plasmatique, lorsqu'il est combiné au tabagisme, augmente considérablement les risques (Langseth, 1995). Parmi l'ensemble des facteurs de risques connus, un taux plasmatique élevé en lipoprotéines athérogènes est prédominant dans la pathologie. En effet, celui-ci est un prérequis pour la plupart des formes de la maladie.

1.3. Les lipoprotéines : caractéristiques, transport et métabolisme

Les lipoprotéines sont des particules globulaires, constituées d'un coeur non polaire de triacylglycérols et d'esters de cholestérol, entouré de phospholipides, de cholestérol et d'un revêtement amphiphile de protéines spécialisées, les apoprotéines (Voet *et al.*, 1998). Les lipoprotéines sont classées en cinq grandes catégories en fonction de leurs rôles et de leurs propriétés physico-chimiques (Tableau I.2). Parmi elles, on distingue les **chylomicrons** qui transportent les **triacylglycérols exogènes** de l'intestin aux tissus; les **VLDL**, **IDL** et **LDL** qui transportent le **cholestérol endogène** du foie aux tissus et les **HDL** qui contribuent au transport du **cholestérol endogène** des tissus au foie (Voet *et al.*, 1998) (Figure I.4). Les VLDL, IDL, LDL sont qualifiées de lipoprotéines athérogènes alors que les HDL sont dites anti-athérogènes. On recommande donc que les LDL plasmatiques ne dépassent pas 130 mg/dl et que les HDL ne soient pas inférieures à 35 mg/dl (Tableau I.3), du moins chez une personne n'ayant pas de maladies cardiovasculaires déclarées. Dans ce cas, les recommandations sont plus strictes.

1.3.1. Les chylomicrons

Les chylomicrons formés par les cellules de la muqueuse intestinale (Shepherd, 1994) sont constitués des apoprotéines B-48, B-100 et E. Les graisses alimentaires solubilisées par les sels biliaires sont reprises par les entérocytes. Elles interagissent

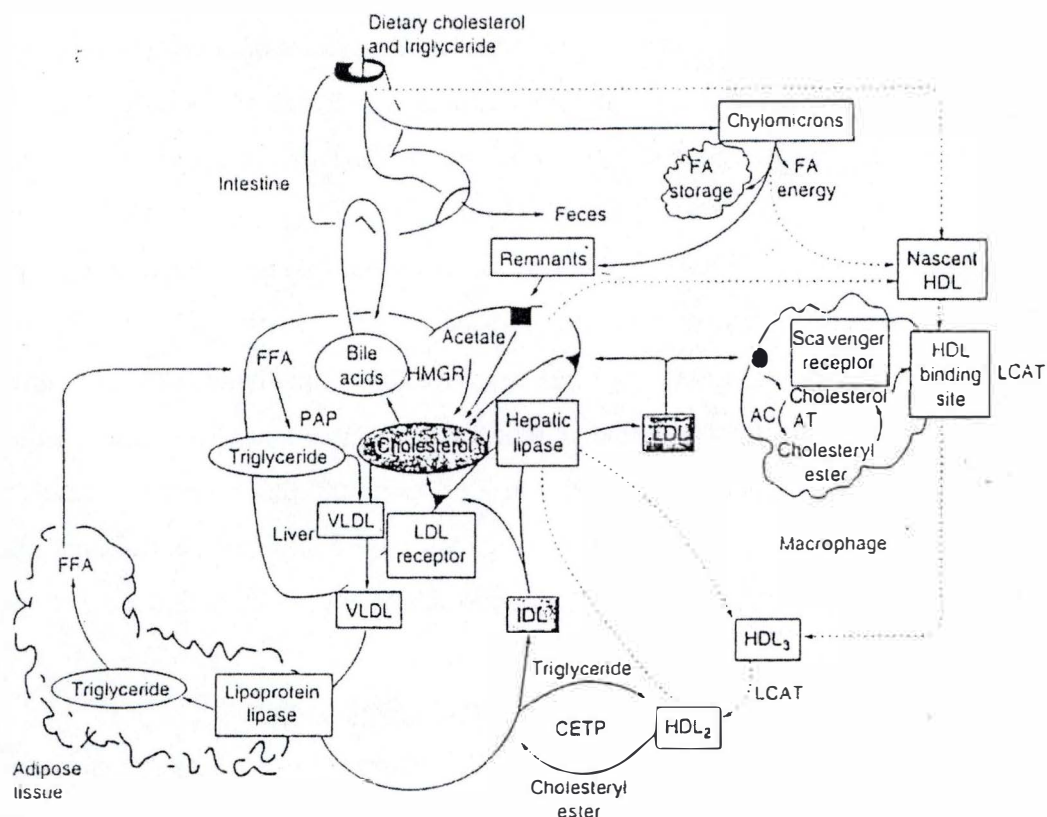


Figure I.4 : Vue d'ensemble du métabolisme des lipoprotéines (Talbert, 1997).

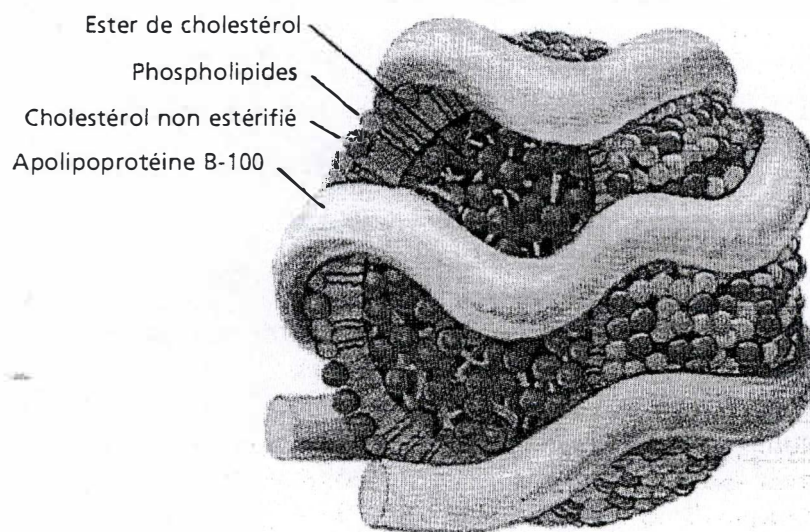


Figure I.5 : Représentation d'une LDL (Voet et *al.*, 1998).

Classification	Total Cholesterol	LDL Cholesterol	HDL Cholesterol	Triglycerides
Desirable/normal	<200 mg/dL	<130 mg/dL	—	<200 mg/dL
Borderline-high	200–239 mg/dL	130–159 mg/dL	—	200–400 mg/dL
High	≥240 mg/dL	>160 mg/dL	>60 mg/dL	400–1000 mg/dL
Very high	—	—	—	>1000 mg/dL
Low	—	—	<35 mg/dL	—

Key: HDL, high-density lipoproteins; LDL, low-density lipoproteins.

Tableau I.3 : Concentration plasmatiques considérées comme souhaitables pour le cholestérol total, les LDL, les HDL et les triglycérides chez une personne sans maladie cardiovasculaire déclarée (Talbert, 1997).

Introduction

intracellulairement avec les apoprotéines pour former les chylomicrons. Ceux-ci sont libérés par le pôle basolatéral des entérocytes et sont repris par les canaux chilifères sous-jacents. Les chylomicrons vont alors être transportés par les vaisseaux lymphatiques avant d'aller se déverser dans les grandes veines du corps grâce au canal thoracique (Voet *et al.*, 1998). Dans la circulation, les chylomicrons adhèrent à des sites de liaison au niveau des tissus adipeux et des muscles. Les triacylglycérols qu'ils contiennent sont hydrolysés par une lipoprotéine lipase (LPL), une enzyme extracellulaire activée par l'apoC-II, transférée aux chylomicrons à partir de HDL (Shepherd, 1994). Les tissus récupèrent alors les produits d'hydrolyse : les monoacylglycérols et les acides gras. Les chylomicrons hydrolysés deviennent des particules résiduelles (ou « remnants »), enrichies en cholestérol. Au niveau du foie, ils sont repris par des « remnants receptors » et internalisés. Ils libèrent alors intracellulairement le cholestérol qu'ils contiennent (Figure I.4).

1.3.2. Les VLDL, IDL et LDL

Les VLDL sont synthétisées par le foie comme vésicule de transport de lipides et sont constituées des apolipoprotéines B-100, C-I, C-II, C-III et E. Dans la circulation sanguine, elles sont converties dans un premier temps par la lipoprotéine lipase en IDL ou VLDL résiduelles. Une partie de celles-ci sont reconnues par les récepteurs aux apolipoprotéines E au niveau de la membrane des hépatocytes et sont dégradées *in situ* (Turpin *et al.*, 1995). Les autres sont transformées en LDL sous l'action de la lipase hépatique. Au cours de la transformation des VLDL en LDL, toutes les protéines, sauf l'apo-B-100, sont éliminées par échange avec d'autres lipoprotéines et la plus grande partie de leur cholestérol est estérifiée par la lécitine-cholestérol-acyltransférase (LCAT). Chaque LDL ne contient qu'une molécule d'apo B-100 qui recouvre la surface de la particule (Figure I.5) et qui permet sa reconnaissance par les récepteurs à l'apoB au niveau du foie, mais également au niveau des autres tissus de l'organisme (Brown *et al.*, 1984). Les LDL chargées en cholestérol et reprises par ces récepteurs sont internalisées par endocytose et catabolisées (Figure I.6). L'apoB est dégradée en acides aminés tandis que les esters de cholestérol sont hydrolysés par une lipase lysosomiale avec libération de cholestérol pouvant s'incorporer dans les membranes cellulaires. Le cholestérol intracellulaire en excès est réestérifié pour être mis en réserve dans la cellule grâce à l'action de l'acyl CoA:cholestérol acyltransférase (ACAT) (Figure I.7). L'accumulation en excès du cholestérol est empêchée par l'inhibition de l'activité de la

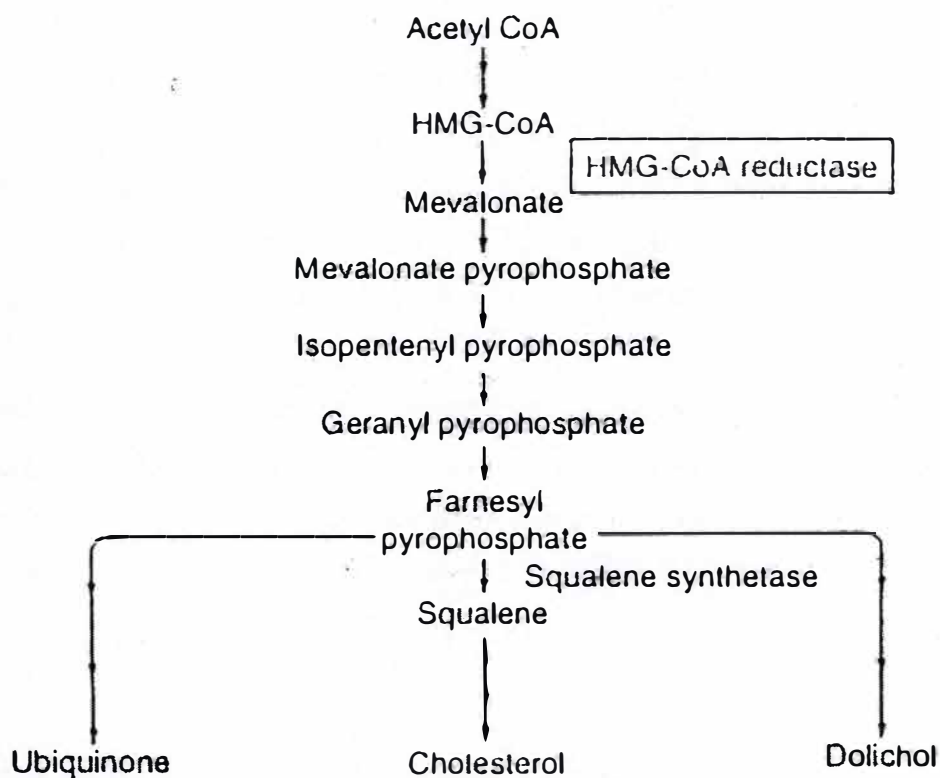


Figure I.8 : Voie de biosynthèse du cholestérol. L'enzyme limitante dans cette voie est la HMG-CoA reductase (Talbert, 1997)

Type	Lipoprotein Elevation	Approximate Mean Lipid Elevation	
		Cholesterol (mg/dL)	Triglycerides (mg/dL)
I	Chylomicrons	324	3316
IIa	LDL ^a	368	148
IIb	LDL + VLDL	354	135
III	IDL (LDL ₁)	441	694
IV	VLDL	251	438
V	VLDL + chylomicrons	373	2071

^aHeterozygotes for familial hypercholesterolemia. (Modified from Schaler EJ. Levy RI. Pathogenesis and management of lipoprotein disorders. N Engl J Med 1985;312:1302)

Tableau I.4 : classification des hyperlipoproteinémies de Frederickson-Levy-Lees

Introduction

HMG-CoA réductase (3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase) (Figure I.8) impliquée dans la biosynthèse intracellulaire du cholestérol et par la réduction de la synthèse des récepteurs aux LDL (récepteurs ApoB100/ApoE), ce qui limite la prise de cholestérol, plasmatique et accélère l'activité de l'ACAT, facilitant le stockage intracellulaire du cholestérol.

1.3.3. Les HDL

Les HDL naissantes sont synthétisées par le foie (Turpin *et al.*, 1995). Elles sont discoïdes et dépourvues d'esters de cholestérol dans leur noyau (Rawn, 1990). Elles prennent leur forme mature dans le plasma par association avec d'autres constituants issus de l'hydrolyse directe des lipoprotéines riches en triacylgérides (chylomicrons et VLDL). Elles sont structurées par les apolipoprotéines A-I, A-II, A-IV et C-II. Leur fonction est double ; elles vont servir de pompe à cholestérol provenant des tissus périphériques. Ce cholestérol va être transformé immédiatement en cholestéryl-ester par la LCAT (Lécitine-Cholestérol Acyl Transférase) activée par l'apo A-I . De cette façon, les HDL continuent à capter le cholestérol et s'enrichissent en cholestéryl-ester. Deuxièmement, elles cèdent les cholestéryl esters aux IDL nécessaires à la formation des LDL, mais elles peuvent aussi être récupérées par le foie via des récepteurs spécifiques aux HDL, auxquels elles cèdent le cholestérol pour la formation de sels biliaires.

1.4. Implication des lipoprotéines dans l'athérosclérose

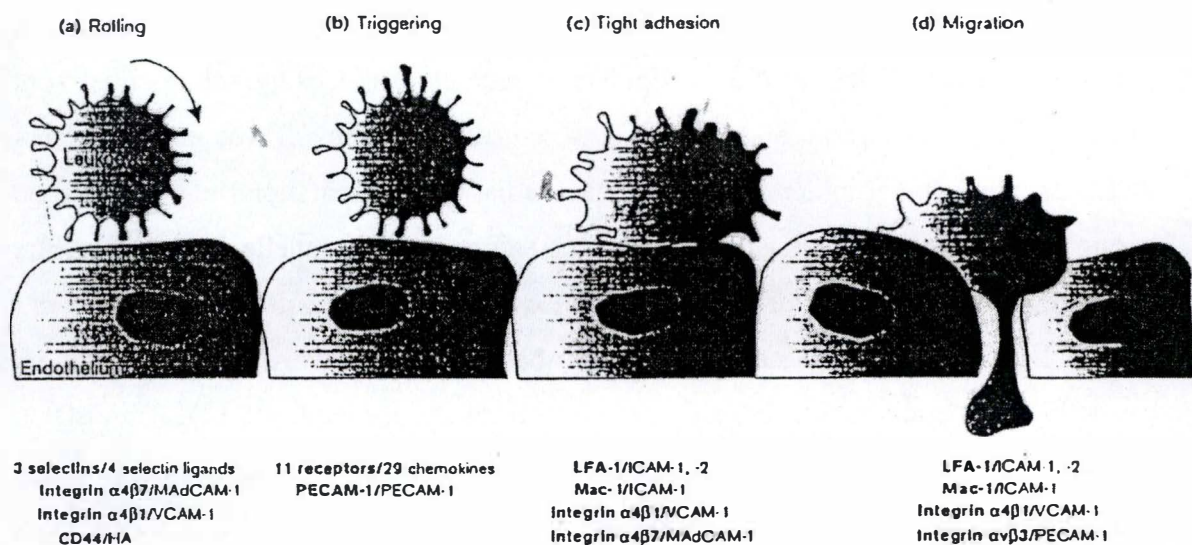
Comme précisé précédemment, des anomalies dans la concentration en lipoprotéines plasmatiques prédisposent à l'athérosclérose. Ces désordres lipoprotéiques sont classés en six catégories (Tableau I.4) dont **quatre** sont à l'origine de lésions athérosclérotiques précoces :

- L'hypercholestérolémie de **type IIa**, caractérisée par une augmentation des LDL (hypercholestérolémie pure, familiale à transmission autosomique dominante monogénique ou non familiale polygénique),
- L'hypercholestérolémie de **type IIb**: LDL et VLDL (hyperlipidémie combinée),
- L'hypercholestérolémie de **type III** : augmentation des IDL (dys-bêta-lipoprotéinémie),
- L'hypercholestérolémie de **type IV**: augmentation des VLDL (hypertriglycéridémie endogène, dépendante des glucides, de l'alcool ou d'une obésité),

Introduction

-L'hypercholestérolémie de **type V**: hyperchylomicronémie et hyperpré- β -lipoprotéinémie (forte augmentation en VLDL).

Au niveau clinique, les hyperlipoprotéinémies de types IIa, IIb, et IV représentent la plus grande majorité des cas d'hyperlipidémies rencontrées. Ces hyperlipidémies sont caractérisées par un niveau plasmatique élevé en LDL ($>160\text{mg/dl}$) (ou en précurseurs de LDL). Cette hyperlipidémie peut-être causée par une alimentation riche en graisses, par un manque de récepteurs aux LDL, par une anomalie fonctionnelle de ces récepteurs ou encore par une augmentation de la synthèse de LDL à partir des IDL (Voet *et al.*, 1998). Leur accumulation au niveau de la subendothéliale, favorisée par exemple en cas de blessure endothéliale, et leur oxydation en minimally modified LDL (mmLDL), activeraient les cellules endothéliales, générant un processus inflammatoire chronique (Lusis, 2000) débouchant sur une lésion athérosclérotique. Outre les LDL, il existe des lipoprotéines (a), contenant l'apo B-100 et pouvant également s'accumuler dans l'intima et promouvoir l'athérosclérose. La lipoprotéine (a) est une particule ressemblant aux LDL, mais contenant un polypeptide additionnel appelé apolipoprotéine (a) qui lie l'apo-B par un pont disulfure (Grainger *et al.*, 1994). Elle se caractérise par la répétition de segments qui sont homologues au plasminogène, une protéine du plasma qui, une fois activée, désintègre les caillots sanguins par protéolyse. On sait que l'apo (a) est particulièrement athérogène si son taux plasmatique dépasse 0.45mg/dl . Son taux, génétiquement déterminé et ne variant pas au cours de la vie, est en corrélation avec le degré d'athérosclérose coronarienne et carotidienne. Son dosage est rendu difficile car il existe une immuno-réactivité croisée avec le plasminogène. La fonction exacte de l'apo (a) chez l'homme n'est pas connue, mais elle pourrait être impliquée dans la cicatrisation des lésions des vaisseaux sanguins (Voet *et al.*, 1998). Enfin, si des lésions athérosclérotiques peuvent apparaître suite à une augmentation de la concentration plasmatique de lipoprotéines dites athérogènes, IDL, LDL, VLDL, elles peuvent aussi être induites par un taux plasmatique insuffisant en HDL ($<35\text{mg/dl}$) (Tableau I.3). Dans ces circonstances, même si le taux en lipoprotéines athérogènes est normal, le transport du cholestérol des tissus vers le foie est réduit, ce qui favorise son accumulation dans les tissus et l'apparition de lésions athérosclérotiques. En outre, les HDL exercent visiblement des effets anti-athérogènes en protégeant les cellules endothéliales et les LDL contre l'oxydation (Nofer *et al.*, 2002).



© 1996 Current Opinion in Cell Biology

Figure I.9 : Le passage des leukocytes du sang au tissu nécessite l'interaction avec l'endothélium vasculaire. Ceci se déroule en quatre étapes: (a) « rolling » le long de l'endothélium vasculaire; (b) signaux de « triggering » qui activent les intégrines leukocytaires; (c) adhérence ferme à l'endothélium vasculaire; (d) migration transendothéliale. Chaque étape est contrôlée par différentes molécules d'adhérence; ces molécules sont indiquées au bas du diagramme. Les molécules leukocytaires sont soulignées, les molécules endothéliales ne sont pas soulignées (Dunon et *al.*, 1996).

1.5. Mise en place et évolution des lésions avec l'implication des monocytes

L'endothélium, avec ses complexes de jonctions serrées, fonctionne comme une barrière à perméabilité sélective entre le sang et les tissus (Lusis, 2000). Les cellules endothéliales, constituant cette barrière, présentent dans les régions artérielles tubulaires, une forme ellipsoïdale et sont alignées dans la direction du flux sanguin. Par contre, au niveau des branchements ou des courbures artérielles, où le flux sanguin est perturbé, elles présentent une forme polygonale sans orientation particulière. Ces régions, où la perméabilité aux macromolécules est plus élevée, sont des sites préférentiels pour la formation de lésions (Gimbrone, 1999).

Il est maintenant bien établi que les LDL sont impliquées dans les événements initiateurs de l'athérosclérose et notamment lorsque leur niveau sanguin est élevé. Dans ce cas, le transport et la rétention des LDL sont augmentés au niveau de ces sites préférentiels plus propices au développement d'une lésion. Les lipides transportés par les lipoprotéines vont être oxydés à l'intérieur de l'intima et ce d'autant plus que la matrice extracellulaire dans l'intima est pauvre en anti-oxidants par rapport au plasma. De telles modifications donnent d'abord des « minimally oxidized LDL » (mm-LDL), qui ont une activité pro-inflammatoire, ce qui a pour conséquence l'activation des cellules endothéliales. L'oxydation des mm-LDL donne progressivement des ox-LDL (ou LDL fortement oxydées) dont les lipides, mais aussi l'Apo B-100 sont fortement altérées par l'oxydation. Ces ox-LDL ne sont plus reconnues par le récepteur à l'Apo B-100/Apo E (récepteurs aux LDL natives) mais bien par des récepteurs dits scavenger, exprimés entre autres par les macrophages. Ceux-ci se « gorgeront » véritablement de LDL, devenant des cellules spumeuses typiques des lésions athéromateuses. Mais revenons aux mm-LDL, capables d'activer les cellules endothéliales.

Les cellules endothéliales activées par les mm-LDL, vont produire des molécules pro-inflammatoires incluant des molécules d'adhérence et des facteurs de croissance. Ces molécules vont avoir pour effet l'activation et l'attraction des monocytes vers le lieu de l'inflammation. L'entrée du monocyte dans l'intima se déroule en une série d'étapes multiples (Figure I.9). La première étape de ce processus est le « **rolling** ». Durant cette phase, le monocyte roule littéralement sur l'endothélium vasculaire et est ralenti par une série d'interactions transitoires impliquant des sélectines-L (O'Brien *et al.*, 1994). Celles-ci sont localisées à l'extrémité de villi émis par les leucocytes (von Andrian *et al.*, 1995) et leur intervention dans l'étape de rolling nécessite une

Leukocyte receptor	Leukocyte expression	Endothelial counter-receptor	Function
Selectins			
L-selectin	All	Glycam-1, PSGL-1, others	Rolling
Integrins			
α M β 2 (Mac-1, Mo-1, CD11b/CD18)	Monocytes, PMN, NK	ICAM-1 (CD54) ICAM-2 (CD102)*, fibrinogen	Firm adhesion Transmigration
α L β 2 (CD11a/CD18)	All	ICAM-1 ICAM-2	Firm adhesion Transmigration
α 4 β 1	All ^b	VCAM-1 (CD106)	Rolling and firm adhesion
α 4 β 7	Lymphocyte subset	MadCAM	Rolling and firm adhesion
α v β 3	All	PECAM (CD31)	Transmigration
Ig superfamily			
IAP (CD47)	All	Thrombospondin	Transmigration
PECAM1	All	PECAM, α v β 3	Transmigration
Others			
PSGL-1	PMN, monocytes, some lymphs	P-selectin (CD62P) L-selectin (CD62L) E-selectin (CD62E)	Rolling
ESL	PMN	E-selectin	Rolling
CD44	All	Hyaluronate	?

*The role of Mac-1 interaction with ICAM-2 in transendothelial migration is unknown.

^bWhile α 4 β 1 has an important role in transendothelial migration of monocytes and lymphocytes, its role in PMN transendothelial migration is uncertain.

Abbreviations: NK, natural killer cell; PMN, polymorphonuclear neutrophil.

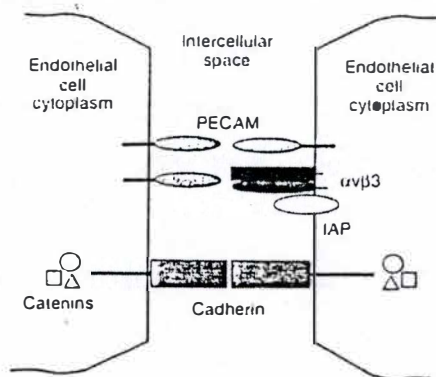
Tableau I.5 : Molécules d'adhésion des cellules leucocytaires et endothéliales (Brown 1997)

Introduction

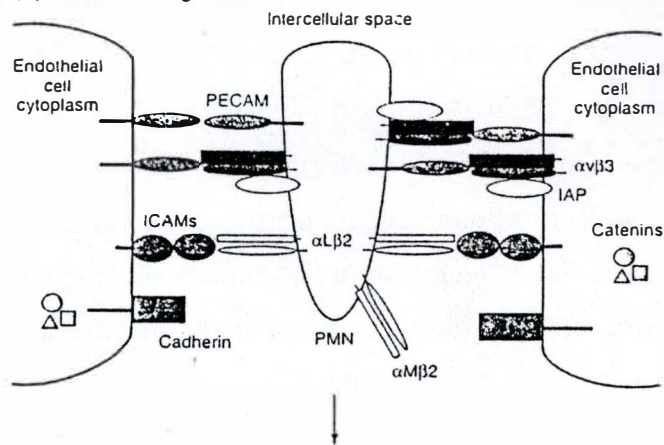
interaction avec le cytosquelette (du monocyte) et plus spécifiquement avec l'actine- α , la vinculine et la taline (Pavalko *et al.*, 1995). Au cours de cette première phase, les L-sélectines sont clivées rapidement (par « shedding ») à partir de la surface cellulaire, à un site protéolytique spécifique (Migaki *et al.*, 1995). Ce clivage contrôle la vitesse des monocytes et par là même, le temps d'interaction de ces derniers avec leur ligand à la surface de l'endothélium (Dunon *et al.*, 1996). Les ligands des sélectines-L sont des Molécules d'Adhérence Cellulaire (CAM), GlyCam1 et Mad Cam (Mucosal addressin Cam) (Alon *et al.*, 1995). L'endothélium vasculaire activé, exprime également des sélectines, mais il s'agit des E-sélectines et P-sélectines. Celles-ci semblent également être impliquées dans le rolling des monocytes car une déficience pour la P-sélectine et E-sélectine en modèle murin, entraîne une réduction du rolling d'un facteur 46 fois par rapport à une souris normale (Frenette *et al.*, 1996). Les P-sélectines endothéliales interagissent avec des PSGL-1 (Ligand dépendant des sélectines-P) et des antigènes CD24 (Ligand monospécifique pour sélectines-P) à la surface des monocytes (Alon *et al.*, 1994). Les E-sélectines interagissent aussi avec le PSGL-1, mais avec une affinité moindre. Par contre, elles interagissent de manière monospécifique avec des ligands pour la sélectine-E (ESL-1) dont l'expression n'a été décrite que dans les cellules myéloïdes (Steegmaier *et al.*, 1995) (Tableau I.5).

La seconde phase du recrutement des monocytes est le « **triggering** ». Elle consiste en l'activation d'intégrines liant fermement le leucocyte à la surface endothéliale et ayant pour effet l'arrêt du rolling. L'activation des intégrines est médiée d'une part par la liaison des L-sélectines à leur ligand lors du rolling (Dunon *et al.*, 1996) et d'autre part par des chémokines. Les chémokines sont de petits peptides se liant à un récepteur spécifique à 7 domaines transmembranaires (à la surface du monocyte), couplé à une protéine G. Les chémokines sont divisées en trois groupes, C, CC et CXC, variant par la position de deux cystéines (Wang *et al.*, 2001). Les chémokines sont très nombreuses mais ont des cibles cellulaires spécifiques. Dans le cadre du triggering du monocyte, on distingue le Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1), une chémokine spécifique promouvant la migration des cellules inflammatoires (Libby, 2000; Reape *et al.*, 1999) et se liant au récepteur CCR2 (CC-Chémokine récepteur 2)(Han *et al.*, 1998).

(a) Interendothelial junction



(b) PMN transmigration



(c) After PMN migration

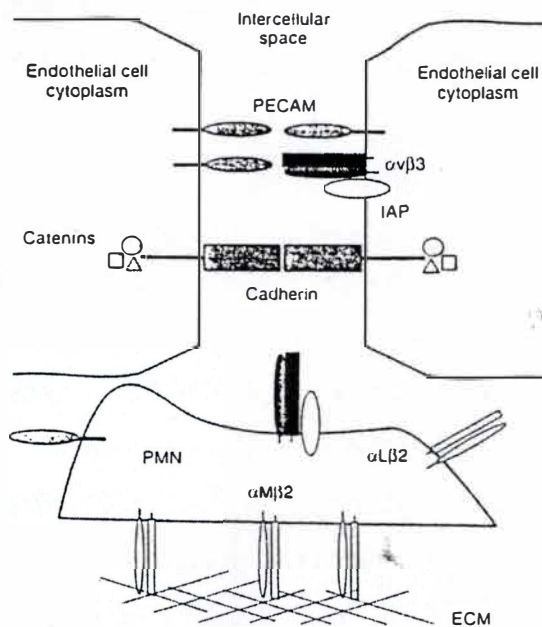


Figure I.10 : Modèle de migration du PMN à travers les jonctions interendothéliales. Ce modèle devrait être applicable au monocyte, dans les grandes lignes (Brown, 1997).

Introduction

L'activation des intégrines par liaison du MCP-1 à son récepteur, engage le monocyte dans une phase **d'adhérence ferme** (**Tight adhesion**) à l'endothélium vasculaire. Les intégrines sont une superfamille de protéines membranaires intrinsèques composées de deux chaînes polypeptidiques transmembranaires α et β , qui sont réunies par des liaisons non covalentes (Karp, 1998). Parmi la vingtaine d'intégrines différentes identifiées (Karp, 1998), interviennent dans le cadre de l'adhérence ferme du monocyte, les intégrines $\alpha 4 \beta 1$, $\alpha 4 \beta 7$, $\alpha L \beta 2$, $\alpha M \beta 2$ (Dunon *et al.*, 1996) et $\alpha 5 \beta 1$ (Ashida *et al.*, 2001). Les deux premières lient les molécules VCAM-1 (Vascular endothelial CAM-1) et Mad Cam-1, alors que les deux suivantes, $\alpha L \beta 2$ (LFA-1 ou Leukocyte function associated molecule 1) et $\alpha M \beta 2$ (Mac-1), lient les molécules d'adhérence ICAM-1. La dernière, $\alpha 5 \beta 1$ lie la fibronectine, protéine de la matrice extracellulaire.

Le monocyte, attaché fermement à la surface endothéliale entre dans l'intima par un processus appelé **extravasation ou diapédèse transverse**. Au cours de cette phase, le monocyte change de forme (Karp, 1998) et passe l'endothélium en s'immiscant à travers les jonctions serrées entre deux cellules endothéliales. Ce processus de transmigration implique des interactions entre des molécules d'adhérence PECAM (Platelet-endothelial Cell Adhesion Molecule), IAP (Integrin-Associated Protein) et $\alpha v \beta 3$ au niveau des cellules endothéliales (Brown *et al.*, 1996; Muller, 1995; Piali *et al.*, 1995) avec des intégrines $\alpha M \beta 2$, $\alpha L \beta 2$ ainsi que des molécules d'adhérence PECAM, IAP, ICAM2, au niveau du monocyte (Brown, 1997). Celui-ci, en immigrant à travers les jonctions inter-endothéliales, recréerait de manière transitoire, par l'intermédiaire de ces différentes molécules d'adhérence, les liaisons existantes initialement entre les deux cellules endothéliales voisines (Brown, 1997) (Figure I.10).

Le monocyte ayant passé de la sorte la barrière endothéliale, se retrouve dans l'intima. En présence de M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor) produit par les cellules endothéliales activées, **le monocyte se différencie en macrophage**. Ce dernier internalise via ses récepteurs scavengers (SR-A, CD36,...) des LDL modifiées (ox-LDL) accumulées dans l'intima. La prise rapide par les macrophages de lipoprotéines oxydées chargées en cholestérol esters, conduit à la formation de cellules spumeuses (« foam-cells »), typiques des lésions athéromateuses (Yamada *et al.*, 1998).

L'accumulation de ces cellules gorgées de cholestérol, forme tout d'abord la **strie lipidique** (Collins, 1996). L'interaction des cellules spumeuses de type macrophage avec les lymphocytes T helper 1 et 2, recrutés en même temps que les monocytes, établit, entre autre, un processus inflammatoire chronique par la sécrétion de cytokines et facteurs de croissance (Glass *et al.*, 2001). Ces derniers induisent la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses de la média vers l'intima (Lusis, 2000). Au cours de leur prolifération, elles synthétisent des protéines de la matrice extra-cellulaire, ce qui conduit au développement d'une **chappe fibreuse**, mais elles peuvent également internaliser des lipoprotéines modifiées, faisant d'elles des cellules spumeuses supplémentaires (Paulsson *et al.*, 2000; Ross, 1999; Steinberg *et al.*, 1989). La nécrose, due entre autre aux ox-LDL, des cellules musculaires lisses et macrophages impliqués dans la lésion athérosclérotique, conduit à la formation d'un corps nécrotique avec accumulation de cholestérol extracellulaire (Glass *et al.*, 2001). Cette lésion plus importante porte le nom de **lésion fibro-graisseuse**. Signalons que des protéases de matrice extracellulaire, sécrétées par les macrophages et l'arrêt de la synthèse de matrice extracellulaire par les cellules musculaires lisses sous l'action de cytokines produites par les lymphocytes T, peuvent conduire à un amincissement de la chappe fibreuse (Lusis, 2000). Celle-ci devient progressivement instable et finit par se rompre. L'exposition au sang de la subendothéliale, normalement isolée par l'endothélium, mais également de TF (Facteur Tissulaire) contenu dans le corps nécrotique, entraîne l'activation des plaquettes et la formation d'un caillot. Ce dernier, s'il obstrue un vaisseau irriguant un organe vital, tel le coeur ou le cerveau, peu entraîner la mort. Voilà pourquoi, les lésions peu obturantes, mais à chappe fibreuses instables, sont les plus dangereuses (Libby *et al.*, 2002).

1.5. Les cytokines

Les phénomènes précoces de l'athérosclérose font intervenir un contexte inflammatoire dans lequel les cytokines jouent un rôle important.

L'activation des cellules endothéliales suite à l'activité pro-inflammatoire des LDL faiblement oxydées, va entraîner, entre autres, la production de MCP-1. Celui-ci entraîne l'activation des monocytes, qui va se mettre à produire des cytokines. Celles-ci sont des médiateurs protéiques à activité autocrine et paracrine, régulant la différenciation, la prolifération et l'activité de différents types cellulaires (Lusis, 2000).

Introduction

Parmi les cytokines, on distingue des monokines produites par les monocytes; des lymphokines produites par les lymphocytes, des interleukines produites par les leucocytes en général et par bien d'autres types cellulaires, enfin, les facteurs de croissance ainsi que d'autres molécules tel le TNF (tumor necrosis factor) ou les IFN (Interferons).

Parmi les cytokines produites par le monocyte, on distingue l'Interleukine-1 bêta et le Tumor Necrosis Factor alpha. Ces deux cytokines sont très rapidement produites durant la réponse inflammatoire (Strieter *et al.*, 1994). Elles stimulent à leur tour de manière paracrine les cellules de l'environnement immédiat induisant chez celles-ci la production d'Interleukine-8, de type C-X-C chémokine, et de MCP-1 appartenant tous les deux à la superfamille des chémokines. Ces chémokines vont avoir pour effet, comme décrit précédemment, l'activation des intégrines, favorisant l'adhérence des monocytes à l'endothélium vasculaire. Elles favorisent également le recrutement des lymphocytes entretenant de la sorte le processus inflammatoire. Il a également été montré que l'IL-8 est un puissant chémo-attractant pour les cellules endothéliales *in vitro* et induit une activité angiogénique *in vivo*. Dès lors, l'IL-8 fonctionnant *in vivo* comme un puissant facteur pro-angiogène dans un contexte athérosclérotique, pourrait être impliquée dans la formation d'anévrismes compensatoires (Koch *et al.*, 1992; Strieter *et al.*, 1992).

La production d'Interleukine-1 bêta induit également la production d'interleukine 6 chez les cellules musculaires lisses (Staels *et al.*, 1998) et chez les monocytes.

Cette production d'interleukine 6 induit l'expression de PDGF (Platelet Derived Growth Factor). Celui-ci promeut notamment la liaison des LDL à leur récepteur et favorise leur accumulation (Cuthbert *et al.*, 1990). Il augmente également la néo-synthèse de cholestérol par l'augmentation de l'expression de la HMG-CoA réductase (Habenicht *et al.*, 1980). Le PDGF active aussi la PLA2 (Phospholipase A2), suite à l'activation, par transduction du signal, de MAPKinases (Habenicht *et al.*, 1981; Pomerantz *et al.*, 1995). La PLA2 produit de l'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires servant de substrat à la cyclooxygénase et à la lipoxygénase, qui génèrent des médiateurs inflammatoires (Prostaglandines, Thromboxanes et Leukotriènes).

Enfin, la production de TNF alpha induit la production d'Interleukine-1 et de PDGF, ce qui entretient d'autant plus le processus inflammatoire (Pomerantz *et al.*, 1995).

On voit donc que les monocytes/macrophages, jouent un rôle important dans l'athérosclérose, que ce soit dans les étapes précoces ou tout au long de l'évolution des lésions. Ce travail sera consacré au rôle des monocytes dans les lésions précoces. Nous y développeront un outil pour suivre l'expression génique des monocytes, exposés à des conditions reconnues comme étant athérogènes. Nous allons donc rapidement passer en revue, les principales approches qui s'offraient à nous.

2. Analyse comparative d'expression génique

L'étude d'expression de gènes, caractérisée par la comparaison entre des situations-contrôles et des situations de stimulation, peut être réalisée tant au niveau des protéines qu'au niveau des ARN messagers.

2.1. Au niveau des protéines

L'étude de l'expression du génome au travers des protéines peut être réalisée tout d'abord par différentes méthodes qui permettent des analyses ponctuelles, limitées à quelques protéines.

2.1.1. Test ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Les protéines extraites à partir de cellules contrôles et tests, sont déposées dans des puits dont le fond a été préalablement traité avec des anticorps primaires reconnaissant une protéine d'intérêt. Les protéines non fixées aux anticorps sont éliminées par lavage. Dans chaque puits, on ajoute des anticorps primaires, identiques à ceux utilisés pour fixer les protéines au fond des puits. Cependant, ceux-ci sont couplés à une enzyme, par exemple la peroxydase de raifort (HRP). L'excès d'anticorps est éliminé par lavage. On ajoute enfin, un substrat incolore qui, sous l'action de l'enzyme couplée à chaque anticorps, est transformé en un produit coloré. L'intensité de la coloration, évaluée par spectrophotométrie, est proportionnelle à la quantité de protéines d'intérêt présentes dans le puits. Cette technique est très sensible et se prête bien pour tester un grand nombre d'échantillons en même temps, grâce à son utilisation en plaque multi-puits. Elle suppose bien évidemment que des anticorps primaires spécifiques soient disponibles, ce qui n'est pas toujours le cas.

2.1.2. Le Western Blot (Immunoblot)

Cette méthode permet d'identifier une protéine (ou antigène) dans divers extraits cellulaires à l'aide d'un anticorps dont la spécificité est connue pour une protéine d'intérêt. Les protéines extraites du modèle cellulaire sont d'abord séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE). Elles sont ensuite transférées du gel sur une membrane de nitrocellulose. Les protéines s'adsorbent à la surface de la nitrocellulose en une réplique du profil protéinique qu'elles formaient dans le gel. Cette membrane est ensuite incubée avec des anticorps dirigés spécifiquement contre la protéine d'intérêt. La membrane est lavée puis incubée avec un anticorps secondaire couplé à une enzyme (souvent la peroxydase) allant se fixer à l'anticorps primaire. La réaction, entre du luminol et de l' H_2O_2 , catalysée par la luciférase, produit de la lumière. Une autoradiographie de la membrane est réalisée en chambre noire. L'intensité de la bande obtenue sur le film photo est proportionnelle à la quantité de protéines présente dans l'échantillon. Il faut toutefois éviter la saturation du signal. Cette technique est très sensible, mais elle suppose bien évidemment que des anticorps primaires spécifiques soient disponibles, ce qui n'est pas toujours le cas.

2.1.3.Électrophorèse à deux dimensions et Protéomique

L'électrophorèse à 2 dimensions, contrairement aux techniques précédentes, est une méthode dite « sans *a priori* ». En effet, elle permet d'étudier les variations d'expression de **l'ensemble des protéines**, en comparant les cellules contrôles et les cellules testées. On parle alors de protéome, par analogie avec le génome qui comprend l'ensemble du patrimoine génétique. L'ensemble des protéines cellulaires est séparé dans une première dimension selon leur point isoélectrique par électrofocalisation selon un gradient de pH. Ensuite, elles sont soumises à une électrophorèse en milieu dénaturant dans la direction perpendiculaire à la première. Les protéines sur le gel sont mises en évidence en général, soit par une réaction à l'argent, soit au bleu de Coomassie. La réaction à l'argent permet de détecter un plus grand nombre de spots sur le gel par rapport à la détection au bleu de Coomassie. Cependant, l'intensité des spots n'est pas proportionnel à la quantité de protéines, car elles ne présentent pas toutes la même affinité pour l'argent. Par contre, la détection au bleu de Coomassie met en évidence moins de spots sur le gel, mais l'intensité de ceux-ci est proportionnelle à la quantité de protéines. Les gels sont analysés et les protéines, dont l'expression est modifiée dans les

cellules tests, sont extraites du gel et identifiées par spectrométrie de masse (Blackstock *et al.*, 1999).

2.2. Au niveau des ARN messagers

L'autre manière d'aborder l'expression des gènes, est de s'intéresser à l'ARN messenger. Parmi les différentes techniques existantes pour mettre en évidence des variations d'expression d'ARN messenger, on distingue les méthodes dites sans *a priori* et avec *a priori*. Les techniques sans *a priori* permettent d'étudier tout le transcriptome, c'est à dire l'ensemble de tous les ARN messagers présents dans les cellules, dans les conditions définies et à un temps donné, alors que les techniques avec *a priori* se limitent le plus souvent à l'étude d'un nombre limité de gènes (Green *et al.*, 2001; Kozian *et al.*, 1999).

2.2.1. Techniques sans *a priori*

2.2.1.1. Differential Display

Cette méthode permet la comparaison différentielle d'expression de gènes entre deux ou plusieurs populations de cellules ou de tissus. L'ARN total est traité avec des DNases pour augmenter sa pureté. Il est ensuite rétro-transcrit en ADN complémentaire à partir d'amorces poly-T terminées à leur extrémité 3' par deux nucléotides aléatoires A, T, G ou C. Cette transcription inverse est suivie d'une PCR réalisée à l'aide de nucléotides radiomarqués, ainsi que des mêmes amorces utilisées pour la transcription inverse. À celles-ci s'ajoutent des amorces de 10 nucléotides aléatoires. Chaque amorce de ce set amplifiera une sous-population d'ADN complémentaire résultant en la génération de centaines de fragments dans un seul tube de réactions.

Une partie des échantillons PCR est séparée selon la taille des fragments par électrophorèse sur gel dénaturant et les patterns d'ADN complémentaires amplifiés sont visualisés par auto-radiographie.

La comparaison des patterns de bandes d'ADN complémentaire, permet de révéler des ADN complémentaires amplifiés de manière différentielle. Ceux-ci peuvent alors être extraits du gel, réamplifiés, clonés et séquencés (Figure I.11) (Kozian *et al.*, 1999).

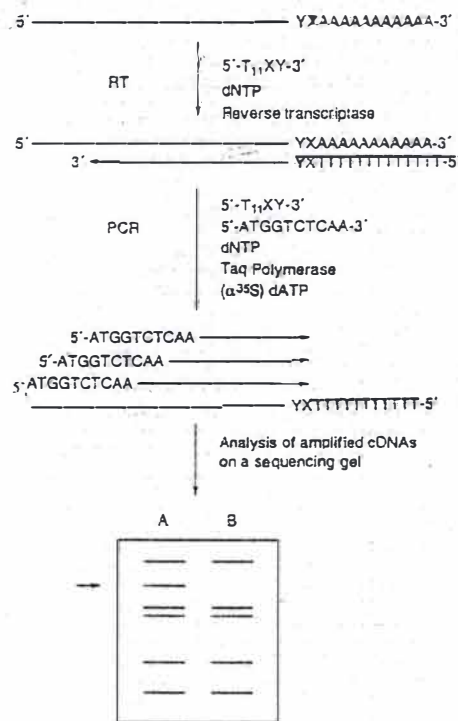


Figure I.11 : Le « Differential Display ». De l'ARN messager total est rétrotranscrit et amplifié avec des amorces aléatoires de 10 nucléotides. L'analyse des produits PCR radiomarqués, dans un gel de séquençage donne les informations au sujet de l'expression de gènes des tissus ou cellules analysés. Les gènes exprimés de manière différentielle (détectables comme des bandes présentes dans une seule ligne du gel) sont extraits du gel pour être analysés (Kozian et al., 1999).

Introduction

L'avantage de cette méthode est qu'elle est simple et permet la détection pratiquement de tous les ARN messagers exprimés en utilisant des combinaisons suffisantes d'amorces. De plus, elle requiert de très faibles quantités d'ARN messager.

Cependant, elle présente l'inconvénient d'être assez lente vu la multiplicité des étapes et présente de nombreux faux positifs, ce qui suppose donc la confirmation par d'autres méthodes (real time PCR, northern blot,...).

2.2.1.2. Damiers à haute densité

Ces damiers sont utilisés pour contrôler le niveau d'expression d'un très grand nombre de gènes, de façon répétée, routinière et reproductible. Ils permettent également l'analyse de séquences et le génotypage. Les damiers sont constitués d'oligonucléotides de 25 bases définis à partir de séquences de référence, sans l'intermédiaire de clones, de produits PCR et d'ADN complémentaires.

Leur synthèse combine la photolithographie et la synthèse d'ADN en phase solide. Sur la surface du support, sont fixés des groupements carboxyl protégés par des groupements photolabiles. Cette surface est éclairée à certains endroits afin d'éliminer les groupes protecteurs photolabiles. Des déoxynucléosides portant des groupements photolabiles sont incubés sur le damier et se lient aux groupement carboxyl disponibles. Ensuite, des régions différentes sont éclairées et, de nouveau, le damier est incubé avec des déoxynucléosides protégés par un groupement photolabile. Les cycles sont répétés un grand nombre de fois de sorte à générer sur l'ensemble du damier des oligonucléotides de séquence déterminée.

Les échantillons d'ARN messager extraits du modèle d'étude sont rétrotranscrits en ADN complémentaire avec incorporation de nucléotides couplés à un fluorochrome. Les ADN complémentaires sont alors hybridés sur le damier. Ils sont mis en évidence grâce à un laser excitateur balayant la surface du damier. La lumière émise est reprise par un détecteur relié à un ordinateur générant une image permettant la quantification. Cette technique peut présenter des problèmes de spécificité et de réactions croisées vu la courte longueur des oligonucléotides constituant le damier. Ces damiers sont commercialement disponibles. Par exemple, la firme Affymetrix (USA) propose différents damiers de ce type dont le « GeneChip® Human Genome U133 Set ». Il s'agit de deux microdamiers dont les caractéristiques sont données le tableau I.6 et qui présentent approximativement 39 000 oligos, correspondant à plus ou moins 33 000 gènes.

Critical Specifications:

Number of Arrays in Set:	Two
Number of transcripts:	~39,000
Number of genes:	~33,000
Number of probe sets:	>45,000
Feature size:	18 μ m
Array format:	Standard Format
Oligonucleotide probe length:	25 mers
Probe pairs/sequence:	11
Control sequences included:	
Hybridization Controls:	<i>bioB</i> , <i>bioC</i> , <i>bioD</i> and <i>cre</i>
Poly-A Controls:	<i>dap</i> , <i>lys</i> , <i>phe</i> and <i>thr</i>
Normalization Control Set:	100 probe sets replicated on both A and B arrays
Housekeeping/Control Genes:	GAPDH, beta-Actin, ISGF-3 (STAT1)
Detection sensitivity:	1:100,000*

*As measured by detection of pre-labeled transcripts derived from human cDNA clones in a complex human background.

Figure I.6 : Tableau reprenant les principales caractéristiques du damier à haute densité de la société « Affymetrix » (www.affymetrix.com).

RZPD (RessourcenZentrum/Primäre Datenbank, Berlin) offre également un service de « gene expression profiling ». Ces damiers à haute densité, sont des membranes de nylon de 22 x 22 cm. Des produits de PCR y sont déposés, à raison de 125 spots par cm². Certaines des membranes proposées par cette société couvrent près de 90% du génome humain.

2.2.2. Technique avec *a priori*

2.2.2.1 Northern blot

Les ARN messagers extraits du modèle d'étude sont séparés par électrophorèse sur gel. Ce dernier est alors recouvert par une membrane de nitrocellulose, laquelle est recouverte de papier absorbant. Le tampon dans lequel baigne le gel est absorbé par capillarité par le papier absorbant. Le flux du tampon à travers le gel entraîne avec lui les ARN messagers. Ceux-ci sont arrêtés par la membrane de nitrocellulose immobilisant les molécules de poids moléculaire important tout en laissant passer le tampon. On obtient de la sorte une réplique du gel sur la membrane. Celle-ci est alors séchée pour immobiliser les ARN messagers à sa surface. Un ARN messenger d'intérêt est alors détecté par l'intermédiaire d'une sonde ARN ou ADN spécifique, marquée radioactivement, et venant s'hybrider à sa séquence anti-complémentaire. Cette technique n'autorise l'étude que d'un seul ARN messenger à la fois pour autant que celui-ci soit très exprimé. Elle requiert en de nombreuses précautions lors des manipulations. Sinon, c'est une méthode classique, qui reste une valeur sûre.

2.2.2.2. PCR en temps réel

Cette technique permet une amplification enzymatique de séquences définies d'ARN messenger tout en déterminant sa quantité initiale dans l'échantillon de manière relative. L'ARN messenger est tout d'abord rétro-transcrit en cDNA au cours d'une transcription inverse. Cette dernière peut être réalisée sur l'ensemble du pool d'ARN messenger de l'échantillon par l'intermédiaire d'amorces oligo-dT ou de manière plus ponctuelle grâce à des amorces spécifiques. Les ADN complémentaires du gène d'intérêt sont ensuite amplifiés par PCR à l'aide d'amorces spécifiques.

Au cours de cette réaction d'amplification, un fluorochrome s'intercale entre les bases d'ADN des molécules double-brin au cours de leur formation. Ces agents

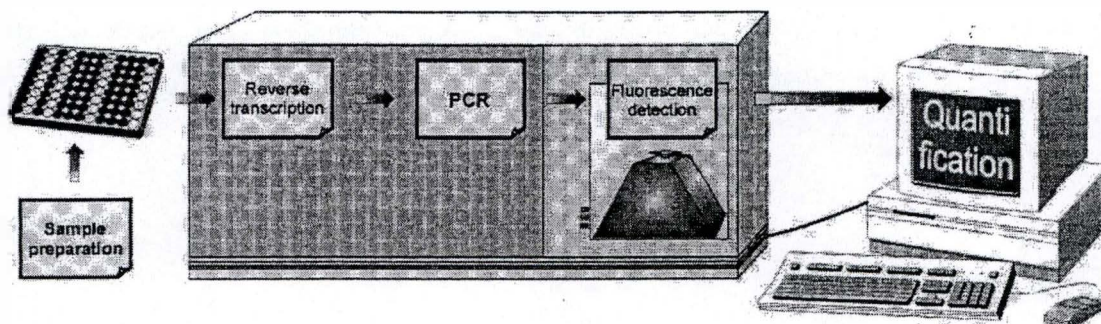


Figure I.12 : Schématisation générale des grandes étapes de la PCR en temps réel (Bustin,2000).

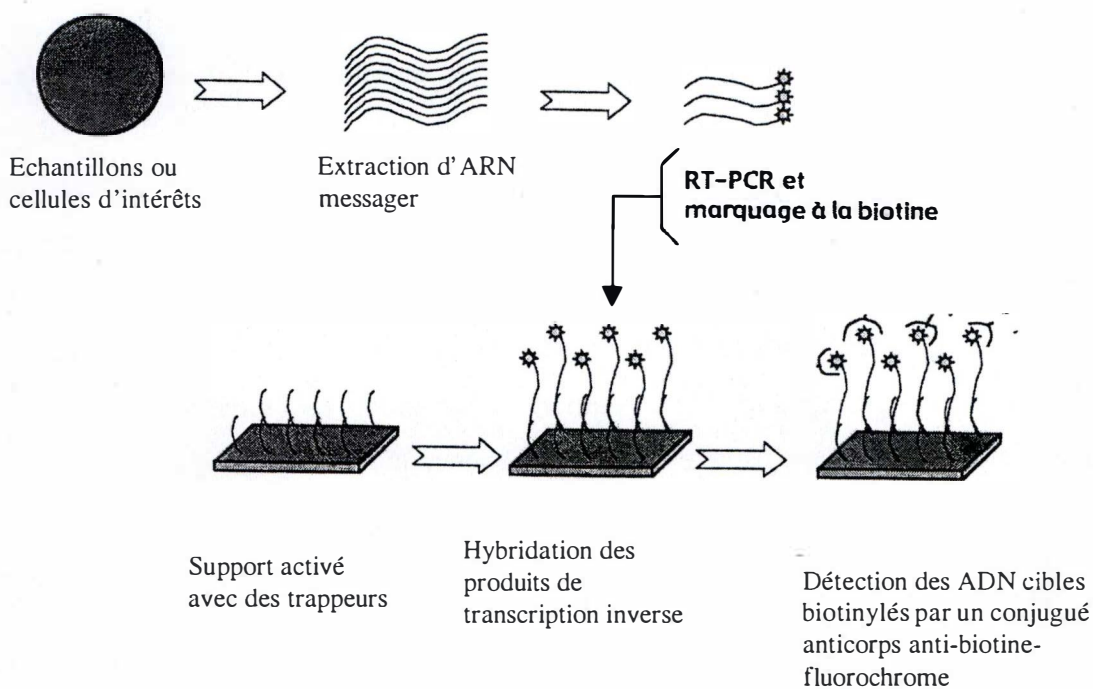


Figure I.13 : Principe général de l'utilisation du microdamier à ADN

intercallants présentent une longueur d'onde d'émission particulière, après leur insertion dans la double hélice d'ADN. De ce fait, la fluorescence émise par l'échantillon au cours de la PCR est proportionnelle à la quantité d'ADN double-brin. Il est donc possible de suivre au cours du temps la synthèse d'ADN et de déterminer à partir de courbes standard, la quantité d'ARN messagers initiale de l'échantillon. L'ensemble de ces étapes est réalisé à l'aide d'une machine combinant un appareil PCR, un laser excitateur et un détecteur de fluorescence; le tout relié à un ordinateur compilant et traitant les résultats (Figure I.12) (Bustin, 2000).

Cette technique présente l'avantage de détecter des ARN messagers en faible abondance ou obtenus à partir d'échantillons limités de tissu. Cependant, elle est très coûteuse.

2.2.2.3. Le microdamier à ADN

Le microdamier permet une étude simultanée de l'expression de plusieurs gènes. Sa construction implique la réalisation par PCR, d'ADN trappeurs de taille définie qui sont fixés à la surface d'un support. Les ADN trappeurs repris sur le microdamier correspondent à une liste de gènes préalablement définie. Le microdamiers réalisé est mis en présence d'échantillons d'ADN complémentaires biotinylés issus de transcription inverse d'ARN messagers. La révélation est réalisée par l'intermédiaire d'anticorps anti-biotine couplé à un fluorochrome (Figure I.13). Un scanner confocal permet l'obtention d'images utilisées pour la quantification de la variation d'expression de gènes entre le contrôle et la condition de stimulation. Cette technique présente l'avantage de permettre en une seule hybridation l'étude de l'expression de l'ensemble des gènes repris sur le damier. Cependant, par rapport aux techniques plus conventionnelles, telle la PCR en temps réel ou le northern blotting, l'élaboration d'un microdamier nécessite du temps, et la technologie qui y est associée est onéreuse.

Il existe différentes méthodes apportant chacune des informations **différentes et complémentaires**. Il faut donc faire un choix. La protéomique est le reflet de ce que la cellule exprime phénotypiquement dans une condition donnée. Elle permet la mise en évidence des modifications post-traductionnelles qui sont importantes dans la régulation de l'activité cellulaire. Cependant, la protéomique présente des limites.

Gènes	Abréviations	Fonctions principales
Facteur de coagulation III (Thromboplastine, Facteur Tissulaire)	TF	« Coagulation »
Thrombomoduline	THBD	« Coagulation »
Antigène CD36 (Récepteur au collagène type I, Récepteur à la thrombospondine)	CD36	Adhésion cellulaire, Endocytose de macromolécules dont LDL oxydées
Chémokine récepteur 2 (C-C motif) isoforme A	CCR2A	Chémotactisme
Macrophage Scavenger receptor 1	MSR1	Endocytose de macromolécules dont LDL oxydées
<u>Peroxisome proliferative activated receptor, alpha</u>	PPARA	Facteur de transcription
Peroxisome proliferative activated receptor, gamma	PPARG	Facteur de transcription
Actine bêta	ACTB	Housekeeping gene
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPD	Housekeeping gene
Interleukine 1 bêta	IL1B	Inflammation
Interleukine 6	IL6	Inflammation
Interleukine 8	IL8	Inflammation
Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	COX2	Inflammation
Tumor Necrosis Factor alpha	TNF α	Inflammation
Intégrine bêta 2	CD18	Rolling et transmigration
L-Sélectine	LSEL	Rolling et transmigration

Tableau I.7 : Liste des gènes définie pour la réalisation du micro-damier (classement par fonctions principales)

En effet, certaines protéines sont peu solubles ou faiblement exprimées, ce qui rend difficile voire même impossible leur détection et donc leur étude.

La transcriptomique présente des approches récentes « all transcriptome » couvrant bien le génome, chez l'homme et la souris. Cependant elle se limite à l'étude de la régulation de l'expression de l'ARN messager qui est différente de la régulation post-traductionnelles des protéines.

Dans le cadre de ce mémoire, nous avons choisi le microdamier à ADN. Tout d'abord, l'URBC dispose de la technologie ainsi que du savoir faire dans la réalisation et l'évaluation des microdamiers à ADN. De plus, dans le cadre de l'étude réalisée, nous avons défini une première liste de gènes potentiellement impliqués dans l'athérosclérose et les conditions inflammatoires. Cette liste était tout à fait compatible avec le design d'un microdamier.

3. Choix des gènes

L'élaboration d'un microdamier à ADN requiert la définition précise d'une liste de gènes dont l'étude de l'expression est relevante dans le cadre de l'étude menée.

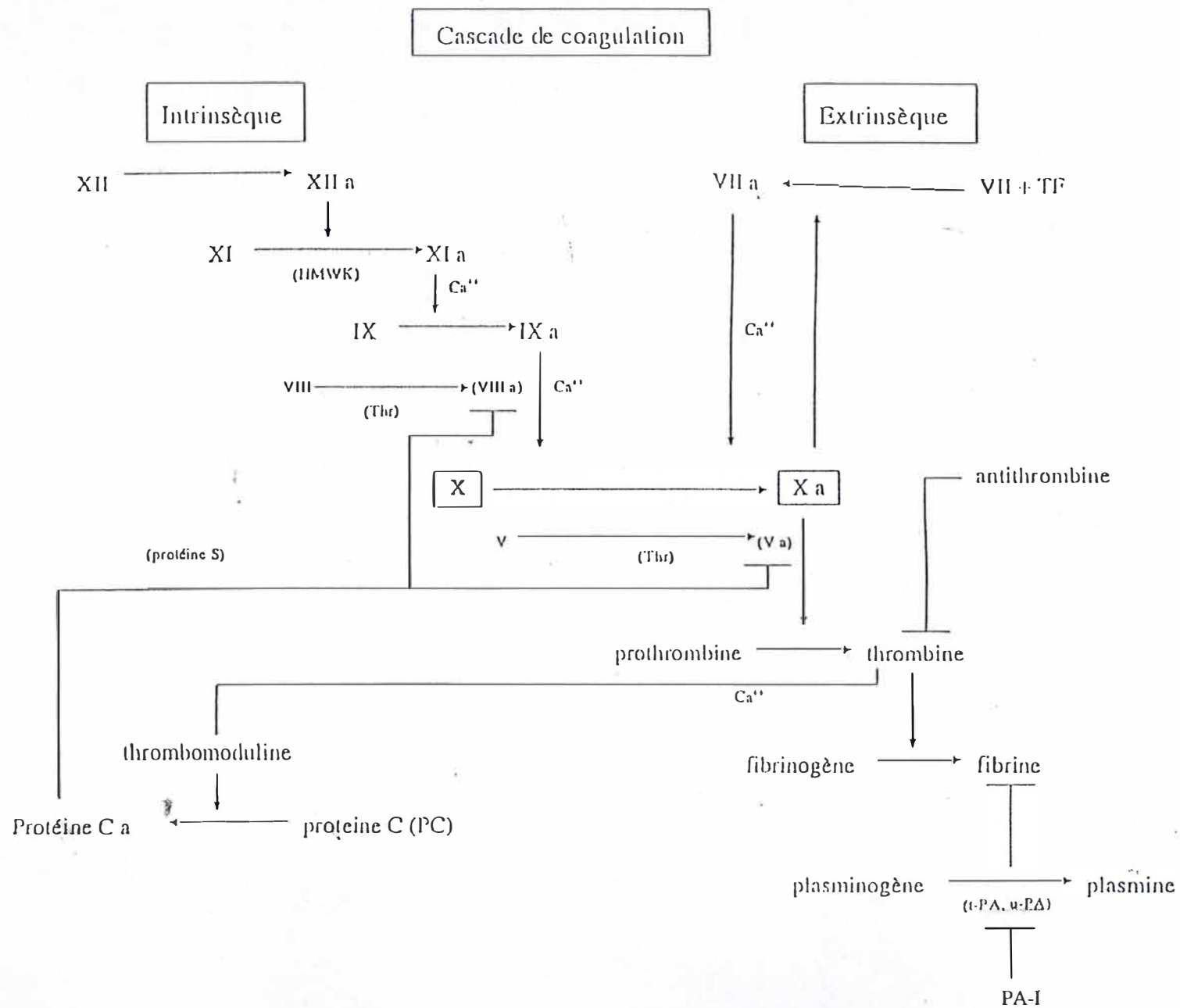
Dans le contexte de l'étude des étapes précoces de l'athérosclérose impliquant le monocyte et caractérisées par un contexte inflammatoire, nous avons défini une liste de gènes reprise dans le tableau I.7.

Dans le cadre de l'étude du contexte inflammatoire, nous avons choisi, tout d'abord, des gènes codant pour l'IL1 bêta, l'IL6, l'IL8 et le TNF alpha qui sont des cytokines impliquées dans la réponse inflammatoire (Nagy *et al.*, 1998).

Ces gènes sont également pertinents pour l'étude du développement des lésions athérosclérotiques. En effet, ils voient leur expression modulée par l'exposition aux LDL oxydées dans les monocytes (Fong *et al.*, 1991; Hamilton *et al.*, 1990; Malden *et al.*, 1991), dont l'implication dans la formation d'athérome est maintenant bien établie. De plus, leur induction induit l'expression par effet autocrine et paracrine, d'autres molécules inflammatoires.

Le recrutement des cellules immunitaires, dont fait partie le monocyte, sur le lieu de l'inflammation implique d'une part, des molécules chimiotactiques et d'autre part, des molécules d'adhérence. En ce qui concerne les molécules chimiotactiques, nous avons

Figure I.14 : Représentation schématique de la cascade de la coagulation adaptée selon Crossman et Tuddenham



Introduction

choisi le gène codant pour le CC-chemokine-Récepteur 2 (CCR2). Celui-ci est un récepteur liant le MCP-1 favorisant le recrutement du monocyte dans l'intima.

Deux isoformes de ce gène existent : CCR2A et CCR2B. Ces deux isoformes du récepteur, sont le résultat d'un épissage alternatif d'un gène unique (Charo *et al.*, 1994).

Le choix s'est porté pour des raisons pratiques sur l'isoforme CCR2A, pour laquelle un clone était disponible au laboratoire, bien que celle-ci soit moins abondante que l'isoforme B au niveau de la surface du monocyte chez l'homme (Charo, 1999). En ce qui concerne les molécules d'adhérence, notre choix s'est porté sur les gènes de la L-sélectine et de l'intégrine bêta 2.

La L-sélectine est impliquée dans le rolling du monocyte sur la surface endothéliale, tandis que les intégrines bêta 2 sont impliquées dans l'adhérence ferme du monocyte à l'endothélium vasculaire.

Le monocyte, infiltré dans la paroi artérielle, se différencie en macrophage. Cette différenciation fait intervenir des éléments régulateurs dont les facteurs de transcription PPAR alpha (Peroxisome proliferator activated receptor alpha) et PPAR gamma (Peroxisome proliferator activated receptor gamma) (Duez *et al.*, 2001). Les gènes codant pour ces 2 facteurs de transcription sont repris sur le microdamier afin de mettre en évidence, d'une part, une éventuelle activation de ceux-ci chez le monocyte dans les étapes initiales de l'inflammation qui traduiraient une préparation à la différenciation de celui-ci en macrophage et d'autre part, pour étudier l'expression de ces gènes chez des monocytes différenciés en macrophage. Pour des raisons identiques, nous avons inclus les gènes des récepteurs scavenger CD36 et MSR1. De plus, l'expression de ceux-ci est régulée par les PPAR (Neve *et al.*, 2000).

Dans le cadre du contexte de l'athérosclérose, le damier portera également des sondes de capture pour le TF et la thrombomoduline (THBD). Le TF et la THBD ont des actions opposées. Le facteur tissulaire a un effet pro-coagulant par l'activation du facteur VII de la cascade de la coagulation (figure I.14). Par contre, la thrombomoduline a une action anticoagulante; elle est un cofacteur essentiel pour l'activation (par la thrombine) de la protéine C, laquelle inhibe la coagulation par inactivation du facteur Va et VIIIa (figure I.14).

L'expression de ces 2 protéines a été mise en évidence à la surface des monocytes. Des variations dans leur expression ont été montrées en conditions inflammatoires (Beretz *et al.*, 1990) chez le monocyte ainsi que chez le macrophage au niveau de lésions athérosclérotiques (Leatham *et al.*, 1995).

De plus, des modulations de leur expression, à savoir une diminution de la thrombomoduline et une augmentation du Tissue Factor, notamment au niveau de la surface du macrophage, seraient responsables des processus initiateurs de la formation de thrombus au niveau de lésions athérosclérotiques humaines.

Enfin, pour la normalisation des données, il a fallu choisir deux « housekeeping genes » dont l'expression doit rester constante pour toutes les conditions d'étude. Le choix s'est porté sur deux gènes fréquemment utilisés dans ce but, codant pour la glycéraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase (GAPDH) et l'actine bêta.

4. Objectif du mémoire

L'objectif du mémoire consiste tout d'abord à réaliser un **microdamier à ADN prototype** permettant la caractérisation de l'expression de gènes potentiellement impliqués dans les étapes précoces de l'athérosclérose, caractérisées par des phénomènes inflammatoires. Il portera 15 sondes de capture dont nous vérifierons la spécificité. Ce microdamier sera ensuite testé sur des populations d'ARN messenger, extraits à partir de cellules THP-1, stimulées ou non. Les cellules THP-1 sont des cellules d'une lignée pré-monocytaire cancéreuse, bien caractérisées et disponibles dans les banques telles que l'ATCC. Cultivées en suspension, elles se comportent *in vitro*, comme des monocytes et ont été utilisées depuis de nombreuses années et par de nombreuses équipes, dans les études d'adhérence aux cellules endothéliales, entre autre dans le contexte de l'athérosclérose. Ces THP-1 seront donc stimulés en conditions pro-inflammatoires et leur ARN messenger sera extrait et rétrotranscrit en ADN complémentaire pour hybridation sur le microdamier.

Les résultats obtenus serviront à la vérification de la bonne fonctionnalité du microdamier et à l'établissement d'une première caractérisation de l'expression de gènes chez ces monocyte en conditions inflammatoires.

II. Matériels et Méthodes

La construction d'un microdamier à ADN est réalisée en une série séquentielle d'étapes. Elle est initiée par la recherche de clones bactériens correspondant à une liste de gènes d'intérêts préalablement définie dans le cadre d'une étude d'expression des gènes. Ces clones bactériens sont sélectionnés sur milieu de culture solide puis multipliés en culture liquide. Ceux-ci sont soumis à une extraction d'ADN plasmidique à partir duquel sont réalisées les PCR servant à la production de trappeurs aminés double brin de 400 pb. La réalisation de ces derniers implique la définition et la commande d'amorces spécifiques. Les trappeurs double brin purifiés, concentrés et quantifiés sont spottés sur lames de verre fonctionnalisées. Les lames, ayant été spottées, subissent enfin différents lavages afin de rendre les trappeurs simple brin. Les microdamiers, rendus, de la sorte, fonctionnels, sont prêts à recevoir des échantillons d'ADN complémentaires issus de transcription inverse d'ARN messagers extraits du modèle d'étude cellulaire.

1. RECHERCHE DE CLONES

1.1. Principe

La réalisation d'un microdamier à ADN nécessite la production de fragments d'ADN d'environ 400 paires de bases, caractéristiques des gènes dont l'expression veut être étudiée et qui servira d'ADN de capture. Ces fragments d'ADN sont produits à partir de morceaux de séquences de gènes d'intérêts, insérés dans des plasmides et contenu dans des bactéries qualifiées de clones.

Chaque clone bactérien présente un insert plasmidique spécifique dont la séquence est reprise dans des banques. Dès lors, l'étude de l'expression de plusieurs gènes par l'intermédiaire d'un microdamier à ADN nécessite la recherche d'un clone bactérien spécifique, caractéristique de la séquence de chacun de ces gènes.

1.2. Méthode

La recherche d'un clone implique la connaissance de la séquence du gène d'intérêt. Cette dernière, critique dans la détermination du clone, sera recherchée dans les banques de gènes via le site NCBI-UNIGENE (www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene).

Pour chaque séquence recherchée, le site propose un ou plusieurs dossiers dont le choix se fait à partir de critères propres à ce qui est recherché.

A l'intérieur du dossier choisi, dans le cadre de l'étude d'expression des gènes, ne sera considéré que le point "mRNA Gene Sequences".

Dans cette rubrique se retrouve une liste de numéros de séquences théoriques du gène d'intérêt auxquels sont associés une brève description.

Parmi ces séquences sont considérées, de manière préférentielle, celles présentant un signal de poly-adénylation.

La détermination de la séquence d'intérêt est déterminée par un alignement multiple des séquences pouvant convenir comme séquence théorique.

Cette alignement permet de déterminer la séquence la plus longue se rapprochant le plus de l'extrémité 3'.

C'est à partir de cette séquence dite "théorique" que le clone va être choisi.

La détermination du clone se fait à partir du site de RZPD (www.rzpd.de) chez qui les clones seront commandés.

Un Blast de la séquence théorique est réalisé sur la banque de clones RZPD.

Le blast donne une liste de clones suivie d'alignements de ces clones avec la séquence théorique. De façon générale, le choix se portera sur la séquence du clone ayant le matching le plus élevé. Cependant, il faudra vérifier que :

- la séquence du clone soit la plus proche de l'extrémité 3' de la séquence théorique et
- qu'elle possède une taille minimum de 400 à 450 paires de bases.

Il est possible que la séquence du clone ayant le plus haut matching ne satisfasse pas à ces conditions. Un autre clone dont la séquence a un matching moins bon, mais satisfaisant à ces conditions sera alors choisi.

De façon pratique, deux ou trois clones sont choisis afin que lors de la commande si le clone choisi n'est pas disponible, un autre puisse lui être substitué sans devoir réaliser une nouvelle recherche.

Les séquences des clones sont alors blastées une à une sur "BLAST" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) afin de vérifier que chaque séquence de clone retrouve bien la séquence théorique.

Enfin, pour s'assurer de la bonne "homologie" entre les séquences des clones et la séquence théorique, un alignement multiple est réalisé entre la séquence théorique et l'ensemble des séquences des clones choisis. Cet alignement est réalisé via le site "BCM Search Launcher: Multiple Sequence Alignments" (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/multi-align/multialign.html>) comme pour le précédent alignement dans la recherche de la séquence théorique.

2. CULTURE BACTERIENNE

Une fois les clones reçus, ceux-ci sont remis en culture, afin d'une part de pouvoir vérifier la séquence plasmidique qu'ils contiennent et d'autre part pour produire cette séquence en grande quantité.

2.1. Culture sur milieu solide Luria Bertani (LB)

Ce mode de culture permet l'obtention de colonie isolée de clones bactériens pour la réalisation d'une culture bactérienne liquide

2.1.1. Matériel

- Bacto TM Agar (Difco, Detroit, USA);
- LB Broth (Difco, Detroit, USA);
- Boîte de pétri 92*16 mm W/O CAMS (SARSTEDT, Nümbrecht, Allemagne);
- Clone bactérien (RZPD Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH., Berlin, Allemagne) ;
- Antibiotique convenant à la souche utilisée. (Ampicilline, Chloramphénicol, ;...)

2.1.2. Méthode

a) Préparation du milieu Luria Bertani

- Réaliser une solution aqueuse (eau distillée) contenant :
 - * LB Broth (2%);
 - * Bacto TM Agar (2%).
- Autoclaver la solution 15 minutes à 121°C : A la sortie de l'autoclave, la solution est placée dans un bain préchauffé à 60°C afin d'empêcher la polymérisation de l'Agar et la solidification du milieu;
- Lorsque la solution a pris la température du bain, ajouter l'antibiotique adéquat pour la souche bactérienne utilisée à une concentration finale de 50 µg/ml;
- Le milieu est alors coulé dans les boîtes de pétri stérile, à la flamme d'un bec de Bunsen, à raison de 20 à 25 ml par boîte;
- Laisser le milieu solidifier;
- Les boîtes peuvent être utilisées de suite ou emballées dans du parafilm et stockées à 4°C pour une utilisation ultérieure.

b) Striation des boîtes du milieu solide

- Strier le milieu solide avec la pointe d'un tips stérile préalablement plongé dans la suspension de clones.
- Les boîtes sont enfin placées dans un incubateur à 37°C pendant une nuit, milieu vers le haut pour éviter l'apparition de condensation sur le couvercle des boîtes).

2.2. Culture en milieu liquide

Ce mode de culture a pour but final l'obtention d'une grande quantité d'ADN plasmidique.

2.2.1. Matériel

- LB Broth, Lennot (Difco, Detroit, USA) (Becton Dickinson and Company, Maryland, USA);
- Tubes 10 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Allemagne);
- Culture bactérienne sur milieu solide;
- Antibiotique.

2.2.2. Méthode

a) Préparation du milieu Luria Bertani

- Réaliser une solution aqueuse (eau distillée) contenant LB Broth (2%);
- Autoclaver la solution 15 minutes à 121°C;
- A la sortie de l'autoclave, laisser refroidir la solution;
- Ajouter l'antibiotique adéquat (50 µg/ml) pour la souche bactérienne utilisée;
- La solution peut être utilisée immédiatement ou stockée à 4°C pour un usage ultérieur.

b) Préparation de la culture liquide

- Déterminer pour chaque boîte de culture bactérienne sur milieu solide 2 colonies isolées;
- Par colonie, préparer un tube de 10 ml contenant 3 ml de solution LB + antibiotique (50 µg/ml);
- Placer un tips stérile sur une micropipette et le passer brièvement à la flamme du bec Bunsen;
- Piquer une colonie avec la pointe du tips et éjecter ce dernier dans le tube;
- Placer les tubes, contenant chacun un tips, dans un incubateur à 37°C, sous agitation (250 rpm), pendant une nuit.

3. EXTRACTION D'ADN PLASMIDIQUE (mini-préparation d'ADN plasmidique)

3.1. Matériel

- Kit miniprep (Qiagen GmbH, Hilden, Allemagne) :
 - * Tampon P1 : tampon de resuspension
 - * Tampon P2 : tampon de lyse
 - * Tampon P3 : tampon de neutralisation
 - * RNase A (100 mg/ml)
- Microtube 39*10 mm de diamètre (Sarstedt, Nümbrecht, Allemagne);
- Phénol-chloroform Isoamyl Alcigik (Sigma, St Louis, USA);
- Ethanol absolu (Merck, Darmstadt, Allemagne);
- Culture bactérienne en milieu liquide;
- Eau désionisée et stérile.

3.2. Méthode

3.2.1. Préparation du tampon P1

Ajouter au tampon P1 la RNase A de sorte que la concentration finale de celle-ci soit de 100µg/µl.

3.2.2. Extraction

- Prélever stérilement 1,4 ml de culture liquide dans un microtube;
- Centrifuger 5 minutes à 15000 rpm à 4°C;
- Eliminer le surnageant;
- Resuspendre le culot dans 200 µl de tampon P1;
- Ajouter 200 µl de tampon P2 et incubé 5 minutes à température ambiante;
- Placer sur glace 15 minutes;
- Centrifuger 15 minutes à 1500 rpm à 4°C;
- Récupérer 500 µl de surnageant dans un nouveau microtube;
- Ajouter sous hotte à ces 500 µl, 500 µl de phénol chloroforme

(prélevé dans la phase inférieure) pour précipiter l'ADN;

- Homogénéiser par inversion du microtube;
- Centrifuger 10 minutes à 15000 rpm à 4°C;
- Reprendre 400 µl de la phase supérieure et y ajouter 2 volumes (800 µl) d'éthanol absolu ;
- Incuber 5 minutes à température ambiante;
- Centrifuger 10 minutes à 4°C;
- Eliminer le surnageant;
- Laver le culot d'ADN avec 300 µl d'éthanol à 70%;
- Centrifuger 10 minutes à 15000 rpm à 4°C;
- Eliminer l'éthanol et laisser sécher le culot;
- Resuspendre enfin dans 20 µl d'eau;
- Congeler.

4. PCR POUR LA PRODUCTION D'ADN DE CAPTURE.

4.1. Principe

La PCR est une technique d'amplification enzymatique qui consiste à amplifier spécifiquement de manière cyclique un fragment d'ADN (matrice) à partir de courts fragments oligonucléotidiques simple brin et grâce à une ADN polymérase thermostable (enzyme).

La PCR est réalisée par l'enchaînement de cycles successifs de dénaturation de l'ADN matrice double brin, hybridation des amorces et polymérisation d'une molécule d'ADN anti-complémentaires à l'ADN matrice par élongation de l'extrémité 3'OH de chacune des amorces.

La répétition de ces cycles permet d'amplifier de manière exponentielle la séquence d'ADN délimitée par les deux amorces et ce, en fonction de la quantité de réactif de départ. Chacune des étapes du cycle est caractérisée par une température et un temps. L'adéquation de ces deux paramètres pour chaque étape du cycle sera déterminante pour l'efficacité de la PCR.

4.2. Choix des amorces

Les amorces sens et anti-sens nécessaires à la PCR sont définies à partir des extrémités de la zone de 400 pb de la séquence d'intérêt à amplifier. Ces amorces doivent être d'une longueur de 20 pb environ et s'apparier parfaitement à leur séquence anti- complémentaire. Elles doivent également présenter une même température de melting définie par la formule $2(A+T)+4(G+C)$. Pour ce, elles sont raccourcies ou allongées de quelques bases si nécessaire. Une fois les amorces définies, il faut vérifier chez celles-ci l'absence de structure en épingle à cheveux (hairpin) ainsi que l'absence de formation de dimères de primers grâce au programme Oligo6. Lorsque ces vérifications ont été réalisées, la PCR avec ses primers est simulée par le programme Amplify (University of Winsconsin, Madison, USA). Cette étape permet de s'assurer que les amorces ne s'hybrident pas à d'autres endroits pouvant entraîner la génération de fragments PCR de tailles non désirées. Les amorces sont ensuite "blastées" pour vérifier qu'elles retrouvent bien la séquence du clone à partir de laquelle elles ont été définies. Enfin, lors de leur commande, il faudra préciser l'ajout d'un groupement amine primaire à l'extrémité 5' de l'amorce sens.

4.3. Matériel

- ADN matrice 2 ng/ μ l (ADN plasmidique issu des clones bactériens);
- Amorces sens aminées à leur extrémité 5' 20 μ M;
- Amorces anti-sens 20 μ M;
- dATP 100 mM (Roche, Mannheim, Allemagne);
- dCTP 100 mM (Roche, Mannheim, Allemagne);
- dGTP 100 mM (Roche, Mannheim, Allemagne);
- dTTP 100 mM (Roche, Mannheim, Allemagne);
- Taq polymérase (Roche, Mannheim, Allemagne);
- Buffer 10X (Roche, Mannheim, Allemagne);
- Eau désionisée;
- Appareil PCR Gene Amp® PCR System 2400 (Applied Biosystems, Foster City ;USA);
- Micro-tubes PCR 0,2 ml (Biozym ;Landgraaf ;Pays-Bas).

4.4. Méthode

- Préparation du Mix PCR en pièce PCR1 contenant :
 - Amorce sens à 1 μ M
 - Amorce anti-sens à 1 μ M
 - dNTP à 200 μ M
 - Taq polymérase à 1 U
 - Buffer 1X
 - Eau désionisée pour porter le volume à 95 μ l
- Dispenser le mix PCR dans les micro-tubes PCR;
- En pièce PCR2, ajouter 5 μ l d'ADN matrice aux tubes test et de l'eau désionisée aux blancs;
- Placer les tubes dans l'appareil PCR et initier le programme suivant :

5 minutes à 94° (dénaturation longue)	
30 secondes à 94° (dénaturation)	} 40 cycles
30 secondes à température de melting -5°C (hybridation)	
30 secondes à 72°C (élongation)	
10 minutes à 72°C (terminaison)	
- Les produits PCR sont conservés à 4°C jusqu'à sortie de l'appareil;
- Placer à -20°C.

5. ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE

Dans le cadre de ce mémoire, cette technique a été utilisée afin de s'assurer que les ADN de capture produits par PCR sont bien de taille attendue et qu'ils sont bien exempts de toute contamination.

5.1. Principe

Cette technique permet la séparation en gel d'agarose, de fragments d'ADN en fonction de leur taille sous l'action d'un champ électrique constant. L'ADN, chargé

négativement, va être repoussé par l'anode, attiré par la cathode et migrer ainsi à travers le gel dont la résolution de séparation dépend de son pourcentage en agarose. Un pourcentage élevé en agarose (2%) permet une bonne séparation de petits fragments d'ADN (100 à 1000 pb) alors qu'un pourcentage moindre permet la séparation de fragments plus grands. Les fragments d'ADN ayant migré sur gel sont mis en évidence par l'intermédiaire de bromure d'éthidium présent dans gel. Au cours de leur migration, celui-ci s'intercale entre les bases des molécules double brin et subit un changement de conformation lui conférant la capacité d'émettre une lumière fluorescente sous l'action d'ultra-violet (U.V.). Dès lors, après la migration des échantillons, le gel sera placé sur un banc U.V. afin de mettre en évidence les fragments d'ADN. L'intensité des bandes obtenues est proportionnelle à la quantité d'ADN présent. Enfin, en parallèle aux échantillons tests, un marqueur de poids moléculaire migre sur le même gel. Celui-ci, constitué de fragments d'ADN de taille connue, permet de déterminer la taille des fragments d'ADN des échantillons tests.

5.2. Matériel

- Agarose (Sigma, St Louis, USA);
- Tampon TBE 10 X (Invitrogen, Paisley, Angleterre)
- Bromure d'éthidium, solution stock de 500 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma; St Louis, USA);
- Bleu de chargement : Blue/Orange 6 X Loading Dyl. (Promega; Madison; USA);
- Marqueur de poids moléculaire : 100 pb DNA Ladder 250 μl (Promega, Madison, USA);
- Cuve d'électrophorèse (Horizon 11-14, Gibco, Paisly, Grande-Bretagne);
- Lampe UV (Vilber-Lourmat, France) ;
- Appareil photo Kaiser RA1 + Photo-print IP-001-SD (Vilber-Lourmat, France) ;
- Film K65HM (Mitsubishi, Japon) + Imprimante P91 (Mitsubishi, Japon) ;
- Générateur EPS 500/400 (Pharmacia, Suède)

5.3. Méthode

a) Préparation du gel à 2% d'agarose

- Préparer la cuve d'électrophorèse et les peignes ad hoc;
- Peser 1,6 g d'Agarose et le dissoudre dans 80 ml de TBE1X;

- Porter à ébullition le mélange en le chauffant au micro-ondes jusqu'à obtenir une solution limpide;
- Laisser au repos pendant une minute afin que la température de la solution diminue;
- Ajouter 15 μ l de bromure d'éthidium;
- Verser le mélange dans le récipient ad hoc pour cuve;
- Placer les peignes;
- Laisser le gel polymériser;
- ôter les peignes;
- Placer le gel avec son support dans la cuve d'électrophorèse remplie de tampon TBE1X

b) Préparation des échantillons

- Pour chaque échantillon PCR, prélever 10 μ l et les introduire dans un nouveau micro-tube;
- Y ajouter 2 μ l de bleu de chargement.

c) Electrophorèse

- Charger les échantillons (12 μ l) dans les puits du gel;
- Réserver pour chaque rangée de puits, un puits dans lequel seront chargés 8 μ l de marqueur de poids moléculaire;
- Fermer la cuve;
- Appliquer une différence de potentiel de 100 volts pendant 60 minutes;
- Le gel est enfin placé sur le transilluminateur à UV pour visualiser les bandes;
- Réaliser une photo du gel sur laquelle devra, à chaque fois, figurer le marqueur de poids moléculaire.

6. PURIFICATION DE PRODUITS PCR

La purification des produits PCR permet l'élimination des primers aminés n'ayant pas réagi lors de la PCR.

6.1. Matériel

- High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Mannheim, Allemagne)
 - * Binding Buffer : - 3M thiocyanate de guanidine
 - 10 mM Tris – HCl pH 6,6 (25°C)
 - 5% éthanol
 - * Wash Buffer : - 20 mM Na Cl
 - 2 mM Tris HCl pH 7,5 (25°C)
 - 20% éthanol
 - * Elution Buffer : eau désionisée
 - * High Pure filter tubes
 - * Tubes collecteurs
- Microtubes 39*10 mm de diamètre (Sarstedt, Nümbrecht, Allemagne).

6.2. Méthode

- Prélever 100 µl de produit PCR et les placer dans un microtube;
- Ajouter 500 µl de Binding Buffer et agiter;
- Combiner le filtre (High Pure filter tube) au tube collecteur;
- Prélever les 600 µl de solution dans le microtube et les déposer sur le filtre;
- Centrifuger 30 secondes à 13000 rpm à température ambiante (Heraeus Instruments, Biofuge Pico, Allemagne);
- Eliminer le contenu du tube collecteur;
- Déposer sur la colonne de purification 500 µl de Wash Buffer (auquel aura été ajoutée la quantité d'éthanol absolu requise);
- Centrifuger 30 secondes à 13000 rpm à température ambiante (Biofuge Pico, Heraeus Instruments
- Eliminer le contenu du tube collecteur;

- Fixer la colonne de purification sur un nouveau microtube;
- Déposer 50 µl d'eau désionisée sur la colonne de purification;
- Centrifuger 30 secondes à 13000 rpm à température ambiante (Biofuge Pico, Heraeus Instruments, Allemagne);
- Ajouter de nouveau 50 µl d'eau désionisée sur la colonne de purification;
- Centrifuger 30 secondes à 13000 rpm à température ambiante (Biofuge pico, Heraeus Instruments, Allemagne);
- Récupérer l'ADN élué et purifié dans le tube collecteur;
- Placer à - 20°C.

7. CONCENTRATION DE PRODUITS PCR

7.1. Principe

Le produit PCR purifié va être concentré par réduction du volume de solvant dans lequel il se trouve. Un microconcentrateur va permettre, sous l'action de la force centrifuge, le passage du solvant tout en empêchant le passage de l'ADN en son sein. De la sorte, l'acide déoxyribonucléique, en quantité égale à celle de départ, se retrouve dans un volume plus petit; dès lors sa concentration se voit augmentée.

7.2. Matériel

- Centrifugal Filter Services, Microncon YM-30 (Millipore, Bedford, USA)
 - * Microconcentrateurs
 - * Tubes collecteurs
- Microtubes 39*10 mm de diamètre (Sarstedt, Mümbrecht, Allemagne);
- Produit PCR purifié.

7.3. Méthode

- Assembler le tube collecteur au microconcentrateur;
- Dispenser par colonne au maximum 500 µl de produit PCR purifié;
- Centrifuger 2 minutes à 13000 rpm à température ambiante (Biofuge Pico, Heraeus Instruments, Allemagne);
- Le contenu du tube collecteur peut être éliminé, par contre le surnageant restant sur la colonne constitue le produit PCR concentré;

- Chaque microconcentrateur est alors retourné et fixé sur un nouveau microtube de sorte que le surnageant du microconcentrateur s'écoule dans le microtube;
- L'ensemble microconcentrateur-microtube est centrifugé 2 minutes à 2000 rpm à température ambiante (Biofuge Pico, Heraeus Instruments, Allemagne) afin de récupérer le maximum de produit PCR.

8. QUANTIFICATION D'ADN DOUBLE BRIN (ds ADN)

Les trappeurs double brin générés par PCR purifiés et concentrés doivent être quantifiés afin que tous soient spottés à une concentration connue. Cette quantification est réalisée à l'aide du picogreen (un agent intercalant pour acides nucléiques double brin). Le picogreen s'intercalant entre les bases d'ADN double brin, subit une modification de conformation le rendant excitable à 480 nm. Le picogreen non intercalé ne sera pas excitable à cette longueur d'onde et la fluorescence obtenue sera proportionnelle à la quantité d'ADN double brin.

8.1. Matériel

- λ DNA 2000 pg/μl (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA);
- TE 20X (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA);
- Picogreen (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA);
- Plaque 96 puits (Greiner bio-one, Allemagne).
- Lecteur de plaques FLUOstar (BMG Labtechnologies, Allemagne) ;

8.2. Méthode

a) Préparation du tampon TE1X

Diluer 20 fois le tampon stock TE20X.

b) Préparation de la solution de picogreen

Diluer 200 fois la solution stock.

Celle-ci doit être préparée juste avant son utilisation et protégée de la lumière.

c) Préparation des échantillons pour la réalisation de la courbe standard

Préparer en triple à partir du stock λ DNA à 2000 pg/ μ l, 50 μ l de solution à 1500 pg/ μ l (dilution 1,3 x de la solution stock)
1000 pg/ μ l (dilution 2 x de la solution stock)
600 pg/ μ l (dilution 3,3 x de la solution stock)
400 pg/ μ l (dilution 5 x de la solution stock)
200 pg/ μ l (dilution 10 x de la solution stock).

Les dilutions adéquates seront réalisées dans du TE1X.

d) Préparation des échantillons à quantifier (en triple)

Préparer en triple pour chacun des échantillons à quantifier, 50 μ l d'une dilution 100 x, 250 x, 500 x, 1000 x.

e) Préparation pour la quantification

- Dispenser 50 μ l des différentes préparations d'ADN (λ ADN et produits PCR) dans la plaque 96 puits;
- Dispenser 50 μ l de TE1X dans 3 puits (blancs);
- Ajouter 50 μ l de la solution de picogreen diluée 200 x dans les puits contenant les suspensions d'ADN ainsi que dans les blancs;
- Mélanger;
- Recouvrir la plaque multipuits avec une feuille de papier aluminium;
- Incuber 2 à 5 minutes à température ambiante;
- Mesurer la fluorescence des échantillons à l'aide d'un lecteur de plaques (excitation : 480 nm, émission : 520 nm).

9. SPOTTING

9.1. Principe

Des fragments d'ADN doubles brin (trappeurs), présentant à une extrémité 5' un groupement amine primaire, vont être déposés sur des lames de verre fonctionnalisées. Celles-ci présentent à leur surface des groupements aldéhydes susceptibles de subir une attaque nucléophile par l'amine primaire des trappeurs double brin. De cette réaction chimique, il en résulte la formation d'une imine ou base de Schiff fixant de manière covalente l'ADN au support de verre.

Le spotting est réalisé grâce à un robot spécialement conçu pour cette tâche. Les trappeurs, disposés dans une plaque multi-puits sont repris un à un par une aiguille montée à l'extrémité du bras du robot et déposés à la surface des lames de verre fonctionnalisées, préalablement fixées sur leur support spécifique. Entre chaque prélèvement de solution d'ADN différentes, l'aiguille est lavée automatiquement avec de l'eau distillée et séchée, afin d'éviter toute contamination entre les différentes solutions d'ADN trappeur.

9.2. Matériel

- Trappeurs aminés 600nM ;
- Lames de verre fonctionnalisées (AAT, Namur, Belgique);
- Spotting buffer A (AAT, Namur, Belgique);
- Spotting buffer B (AAT, Namur, Belgique);
- Robot (Wow, Belgique);
- Aiguille de 250 μ m de diamètre (Genetix, Angleterre).

9.3. Méthode

a) Préparation des échantillons

- Pour chaque trappeur, préparer le mélange suivant :

Un volume de buffer A + un volume de buffer B contenant les trappeurs à 300 nM final.

b) Spotting

- Disposer dans une plaque 384 puits les différentes solutions de spotting;
- Disposer les lames de verre fonctionnalisées sur le support ad hoc du robot ainsi que la plaque 384 puits;
- Introduire dans l'ordinateur commandant le robot les données suivantes :
 - Le nombre de lignes du damier
 - Le nombre de colonnes du damier
 - L'espacement entre les spots à l'intérieur du damier
 - Le nombre de damiers par lame
 - La position de chaque damier sur la lame
 - La solution à spotter pour chaque spot
- Lancer le spotting
- Conserver les lames à 4°C une fois le spotting terminé.

10. LAVAGE DES LAMES

10.1. Principe

Les lames de verre ayant été spottées doivent subir une série de lavages afin d'être utilisable pour l'étape d'hybridation. Les lames sont tout d'abord lavées avec une solution de SDS 0,2% afin d'éliminer les impuretés ayant pu se déposer au cours du spotting. Ensuite, elles sont plongées dans un bain fait d'une solution de NaBH_4 afin de rendre inaccessible les fonctions aldéhydes encore libres. Enfin les lames sont passées dans un bain d'eau bouillante afin de dénaturer les trappeurs double brins. Le simple brin aminé ayant réagi avec la fonction aldéhyde reste fixé à la lame de verre tandis que sa partie anti-complémentaire non liée au support passe en solution. Il ne reste alors que des trappeurs simple brin pouvant lier leur cibles anti-complémentaire.

10.2. Matériel

- Sodium dodécyl Sulfate 10% (Merck, Darmstadt, Allemagne);
- Sodium Borohydride (NaBH_4) (Aldrich Chemical, Milwaukee, USA)
- PBS fraîchement préparé: - $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 10mM pH 7,4 (Merck, Darmstadt,

Allemagne);

- NaCl 0,9% (Merck, Darmstadt, Allemagne);

- Ethanol 100% (Merck, Darmstadt, Allemagne);

10.3. Méthode

a) Préparation des solutions

- Solution de SDS 0,2% : Dilution de la solution à 10% dans de l'eau désionisée ;
- Solution de NaBH_4 : NaBH_4 2,5mg/ml dissout juste avant emploi dans une solution de PBS 75%/Ethanol 25%.

b) Lavages

- Plonger les lames dans une solution de SDS 0,2% pendant 2 minutes à température ambiante (agiter doucement);
- Rincer les lames, deux fois, en les immergeant dans un bain d'eau distillée pendant deux minutes à température ambiante (agiter doucement);
- Immerger les lames dans une solution de NaBH_4 à température ambiante pendant 2 minutes (agiter doucement);
- Rincer les lames en les immergeant dans un bain d'eau distillée pendant deux minutes à température ambiante (agiter doucement);
- Passer les lames 3 minutes dans l'eau bouillante;
- Laisser sécher les lames à température ambiante et les ranger à 4°C.

11. CULTURE CELLULAIRE

11.1. Culture des cellules THP-1

Au cours de ce mémoire, la lignée cellulaire THP-1 a été utilisée comme modèle d'étude. Cette lignée a été établie en 1978 à partir de cellules périphériques du sang d'un garçon âgé de un an, atteint d'une leucémie monocyttaire aigüe et en rechute (Tsuchiya *et al.*, 1980). Ces cellules se divisent rapidement en formant des grappes

rester en suspension dans le milieu de culture. Les THP-1 sont repiquées tous les trois jours à raison de trois millions de cellules par boîte de culture T75.

11.2. Matériel

- RPMI (Gibco BRL, Grand Island, N.Y., USA);
- Sérum de veau fœtal (Gibco BRL, Grand Island, N.Y., USA);
- Fungizone (Gibco BRL, Grand Island, N.Y., USA);
- PEN-STREP : 10000 U Pénicilline/ml, 10000 µg Streptomycine/ml (Bio Whittaker Europe, Verviers, Belgique);
- Boîtes de culture stériles de 75 cm² (T75) (Costar, USA);
- Tubes de 10 ml (Becton Dickinson, Maryland, USA);
- Centrifugeuse : Biofuge 17 RS (Heraeus Sepatech, Osterode, Allemagne);
- Pipettes stériles 2 ml, 5 ml et 10 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Allemagne);
- Etuve à 37°C/5% CO₂ (Heraeus Sepatech, Osterode, Allemagne).

11.3. Méthode

En condition stérile et sous hotte :

- Préparer le milieu de culture :- Milieu de RPMI (+ 0,1 % Fungizone + 0,5 % PEN-STREP) + 10 % de sérum de veau fœtal;
- Les 15 ml de suspension cellulaire d'une boîte T75 sont centrifugées 7 minutes à 1000 rpm (100 µl sont préalablement prélevés pour le comptage cellulaire);
- Le surnageant est écarté et le culot est resuspendu dans du milieu de culture de sorte à obtenir une suspension cellulaire à une concentration de 3 million de cellules par ml;
- Un ml de cette suspension est ajouté à 14 ml de milieu de culture pour chaque nouvelle boîte T75;
- Les cellules incubées dans une étuve conditionnée à 37°C et 5 % de CO₂.

12. COMPTAGE CELLULAIRE

12.1. Matériel

- Suspension cellulaire
- Bleu de trypan (Sigma, St Louis, USA);
- Cellule de Neubauer (Marienfeld, Allemagne)
- Microscope (Leica, Wetzlar, Allemagne)

12.2. Méthode

- 100 µl de suspension cellulaire sont mélangés à 100 µl de bleu de trypan (dilution 2 fois). Celui-ci permet de différencier les cellules mortes, dont le cytoplasme est coloré en bleu, des cellules vivantes incolores;
- Le mélange est alors déposé sur une cellule de Neubauer et passe sous le couvre objet de la cellule par capillarité. Celle-ci est divisée en deux fois quatre carrés quadrillés délimitant la zone de comptage.

Le nombre de cellules par ml est alors déterminé par la formule suivante :

$$\frac{\text{Nombre de cellules comptées} * 2 * 10000}{8}$$

où : -"2" correspond au facteur de dilution

- "10000" correspond au facteur volumétrique (un carré contient 0,1 mm³ de suspension cellulaire)

- "8" correspond au nombre de carrés comptés.

13. STIMULATION DES THP-1

13.1. Matériel

- Milieu de culture : RPMI (+0,1% Fungizone + 0,5% PEN-STREP) + 10% de sérum de veau fœtal (pour informations complémentaires, voir culture cellulaire);
- LPS (stock de 2 mg/ml);
- Boîtes de culture stériles de 25 cm² (T25) (Costar, USA);

- Tubes de 10 ml (Becton Dickinson, Maryland.USA).

13.2. Méthode

- Repiquer les THP-1 en boîte de culture stérile (T25) à raison de un million de cellules par boîte;
- Incuber 3 jours à l'étuve à 37°C ;5% CO₂;
- Ajouter 10 µl de LPS (10µg/ml final);
- Placer à l'étuve à 37 °C; 5% CO₂, pour une durée de stimulation prédéfinie.

14. EXTRACTION D'ARN MESSAGER DE CELLULES MONOCYTAIRES THP-1

14.1. Principe

Le microdamier réalisé permet l'étude d'une partie du transcriptome. Ce dernier est matérialisé par l'ARN messager qui doit être isolé des différents constituants cellulaires, ainsi que de l'ADN, des ARN ribosomiques et des ARN de transferts. Pour cela, les cellules, préalablement stimulées ou non, sont lysées. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation. Les ARN messagers sont séparés des autres constituants cellulaires par l'intermédiaire de billes de cellulose présentant des oligos dT auxquels ils se lient par leur queue poly-A. Les billes de cellulose sont isolées et l'ARN messager qui y est accroché est élué. Celui-ci est quantifié par spectrophotométrie, puis précipité pour enfin être resuspendu à la concentration voulue.

14.2. Matériel

- Micro-FastTrack™2.0 Kit (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA);
 - Stock Buffer : - 200 mM NaCl
 - 200 mM Tris, pH 7,5
 - 1,5 mM MgCl₂
 - 2% SDS
 - Protein/Rnase Degradar : mélange de protéases
 - Binding Buffer : - 500 mM NaCl
 - 10 mM Tris-Cl, pH 7,5 dans de l'eau traitée DEPC

- Low Salt Wash Buffer : - 250 mM NaCl
 - 10 mM Tris-Cl, pH 7,5 dans de l'eau traitée DEPC
- Elution Buffer : - 10 mM Tris-Cl, pH 7,5 dans de l'eau traitée DEPC
- Acétate de Sodium 2M : - Acétate de Sodium 2M, pH 5,2 dans de l'eau DEPC
- NaCl 5M : - NaCl 5M dans de l'eau traitée DEPC
- Glycogen carrier : - 2 mg/ml dans de l'eau traitée DEPC
- Poudre de cellulose oligo(dt)₂₀₋₃₀ : Cellulose oligo(dt) lyophilisée pré-disposée dans des micro-tubes à raison de 252 mg par fiole.
- Spin columns
- Microcentrifuge Tubes
- Eau Rnase free
- Seringue stérile avec aiguille 21G x 1 1/2" – 0,8 x 40 mm (TERUMO, Leuven, Belgique);
- Ethanol 100% (Merck, Darmstadt, Allemagne);
- Centrifugeuse : Biofuge 17 RS (Heraeus Sepatech, Osterode, Allemagne);

14.3. Méthode

a) Préparation des échantillons

- Comptage cellulaire;
- Transférer les cellules dans des tubes de 10 ml et centrifuger 7 minutes à 1000 rpm;
- Décanter le surnageant;
- Resuspendre le culot dans 5 ml de PBS froid (4°C);
- Centrifuger pendant 7 minutes à 1000 rpm;
- Eliminer le surnageant;
- Resuspendre le culot dans du PBS froid (4°C) de sorte à avoir un maximum de 5 millions de cellules par millilitre ;
- Transférer la suspension cellulaire dans des microtubes à raison de 5 millions de cellules maximum par microtube;

b) Lyse des cellules

- Centrifuger les microtubes 5 minutes à 2000 rpm à 4°C;
- Préparer pendant ce temps le tampon de lyse : pour un microtube, mélanger :
1ml de Stock Buffer à 20 µl de protein/Rnase Degradar;
- Après centrifugation des microtubes, éliminer le surnageant;
- Ajouter à chaque microtube 1 ml de tampon de lyse et resuspendre le culot;
- Homogénéiser les cellules avec une seringue munie d'une aiguille 21G x 1 1/2" – 0,8 x 40 mm (2 à 4 fois) jusqu'à obtenir une solution fluide;
- Incuber 20 minutes à 45°C;
- Ajouter 63 µl de NaCl 5M par millilitre de lysat (bien mélanger);
- Cisailler l'ADN avec une seringue munie d'une aiguille 21G x 1 1/2" – 0,8 x 40 mm jusqu'à ce que la solution ne soit plus visqueuse;
- Transférer la solution dans une fiole contenant des billes de cellulose. Bien resuspendre la cellulose;
- Agiter doucement les tubes pendant 20 minutes à température ambiante;
- Centrifuger à 6000 rpm pendant 5 minutes à température;
- Éliminer le surnageant délicatement (Culot fragile).

c) Lavages de la cellulose

- Resuspendre les billes de cellulose dans 1,3 ml de Binding Buffer et centrifuger 5 minutes à 6000 rpm à température ambiante (Répéter l'opération 3x);
- Resuspendre la cellulose dans 300 µl de binding Buffer et transférer l'échantillon dans une Spin Column;
- Centrifuger à 6000 rpm pendant 10 secondes à température ambiante
- Éliminer le liquide contenu dans le tube collecteur;
- Laver avec 500 µl de Binding Buffer;
- Centrifuger à 6000 rpm pendant 10 secondes à température ambiante;
- Ajouter 200 µl de Low Salt Buffer et resuspendre la résine;
- Centrifuger à 6000 rpm pendant 10 secondes à température ambiante et éliminer le contenu du tube collecteur;
- Ajouter de nouveau 200 µl de Low Salt Buffer et resuspendre la résine;

- Centrifuger à 6000 rpm pendant 10 secondes à température ambiante et éliminer le contenu du tube collecteur.

d) Elution et précipitation de l'ARN messenger

- Transférer la Spin Column sur un nouveau microtube;
- Ajouter 100 µl d'Elution Buffer et resuspendre les billes de cellulose;
- Centrifuger à 6000 rpm pendant 10 secondes à température ambiante (Conserver le contenu du tube collecteur (ARN));
- Resuspendre les billes de cellulose avec 100 µl d'Elution Buffer;
- Centrifuger à 6000 rpm pendant 10 secondes à température ambiante
- Enlever la colonne;
- Déterminer la concentration de l'ARN messenger récolté :
 - Prélever 14 µl d'échantillon;
 - Ajouter 56 µl d'Elution Buffer (Dilution 5X)
 - Mesurer l'absorbance à 260 nm
 - Déterminer la concentration en ARN messenger des échantillons dilués en sachant qu'une unité d'absorbance correspond à une concentration de 40 µg/ml
 - Multiplier la concentration obtenue par 5 (facteur de dilution) pour obtenir la concentration finale en ARN messenger des échantillons récoltés.
- Ajouter aux 400 µl récolté dans le tube collecteur :
 - 10 µl de glycogène carrier
 - 30 µl de Sodium Acétate
 - 600 µl d'éthanol absolu.
- Bien mélanger;
- Congeler pendant 30 minutes à -70°C ;
- Décongeler et centrifuger à 16000 rpm pendant 15 minutes à 4°C ;
- Eliminer le surnageant;
- Laisser sécher le culot en laissant le microtube ouvert pendant 5 à 15 minutes;

- Resuspendre l'ARN messenger dans 10 µl d'eau Rnase free
- Conserver à -80°C

15. TRANSCRIPTION INVERSE (RT)

15.1. Principe

Cette technique permet la synthèse d'ADN complémentaire (cDNA) à partir d'ARN messenger (ARNm). Elle fait appel à des amorces poly-T venant s'hybrider sur la queue poly-A des ARN messagers. La synthèse du brin d'ADN complémentaire est réalisée par l'élongation de l'amorce poly-T à partir de son extrémité 3'OH par une Superscript Reverse Transcriptase. Lors de la transcription inverse, il y a incorporation de dCTP biotinylés afin que les ADN complémentaires produits puissent être détectables après leur hybridation à leurs trappeurs anti-complémentaires sur le micro-damier.

15.2. Matériel

- ARN messenger extrait de monocytes THP-1;
- Amorce poly-T : oligo (dT)₍₁₂₋₁₈₎ (Gibco BRL, Gaithersburg, USA);
- Superscript TMII Rnase H 200 U/µl (Gibco BRL, Gaithersburg, USA);
- Rnasin Ribonuclease Inhibitor 40 U/µl (Promega, Madison, USA);
- Ribonuclease H 2 U/µl (Gibco BRL, Gaithersburg, USA);
- Eau Rnase free (Promega, Madison, USA);
- dATP 100 mM (Roche, Mannheim, Allemagne);
- dCTP 100 mM (Roche, Mannheim, Allemagne);
- dGTP 100 mM (Roche, Mannheim, Allemagne);
- dTTP 100 mM (Roche, Mannheim, Allemagne);
- dCTP 10 mM (Roche, Mannheim, Allemagne);
- dCTP biotinylés 1mM (Roche, Mannheim, Allemagne);
- Buffer RT 5 X (Invitrogen, Paisley, Angleterre);
- Dithiotreitol (DTT) 0,1 µM (Gibco BRL, Gaithersburg, USA);
- Standards Internes (AAT, Namur, Belgique) :
 - RCA 0,1 ng/µl
 - RBCL 1 ng/µl
 - CAB 10 ng/µl

15.3. Méthode

a) Préparation du MIX d'ARNm

Mélanger : - 2 μ g d'ARN messager pour un volume maximum de 4,5 μ l;

- 2 μ l d'oligo dT (500ng/ μ l);
- 1 μ l RCA
- 1 μ l RBCL
- 1 μ l CAB
- H₂O Rnase free pour porter à un volume de 9,5 μ l .

b) Préparation du MIX de dNTP10X

Mélanger : - 2 μ l dATP (100 mM) (48,54 nM final);

- 2 μ l dTTP (100 mM) (48,54 nM final);
- 2 μ l dGTP (100 mM) (48,54 nM final);;
- 3,2 μ l dCTP (10mM) (77,67 nM final);
- 32 μ l dCTP biotinylés (1mM) (776,70 nM final).

c) Préparation du mix de réaction

Pour un échantillon, mélanger : - 4 μ l de Buffer RT 5X;

- 2 μ l DTT 0,1 M;
- 1 μ l RNAsin (40 U/ μ l);
- 2 μ l du mix de dNTP.

d) Transcription inverse

- Incuber le mix d'ARNm 10 minutes à 70°C;
- Incuber directement sur glace pendant 5 minutes puis centrifuger brièvement;
- Ajouter 9 μ l de mix de réaction par échantillon;
- Incuber 5 minutes à température ambiante;
- Ajouter 1,5 μ l de Superscript RII (200 U/ μ l);
- Incuber 1h30 à 42°C;
- Ajouter 1,5 μ l de Superscript RII (200 U/ μ l) ;
- Incuber 1h30 à 42°C;

Réaction d'hybridation

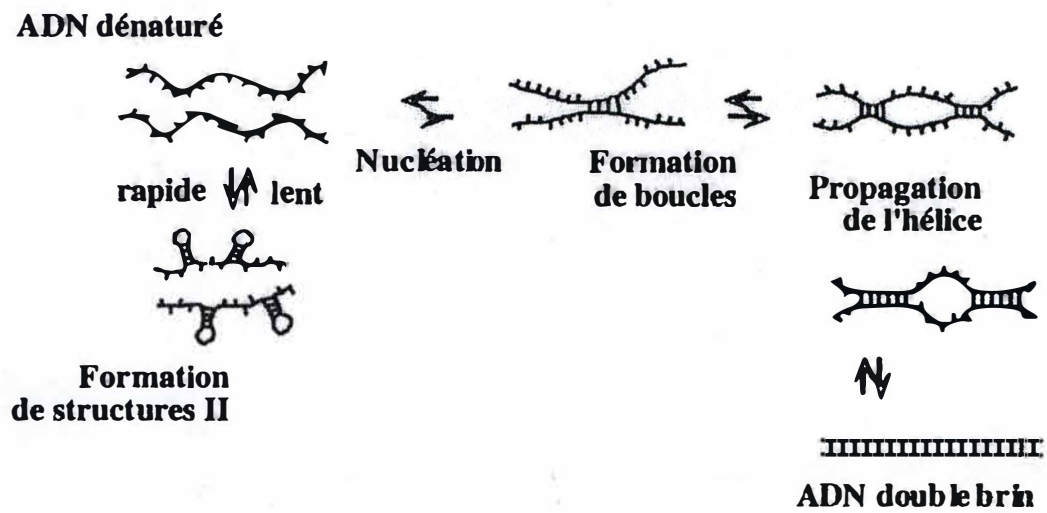


Figure II.1 : Etapes de la réaction d'hybridation ou de réassociation de deux brins d'ADN.

- Incuber 15 minutes à 70°C;
- Ajouter 1 μ l de RnaseH (2U/ μ l);
- Incuber 20 minutes à 37°C;
- Dénaturer 3 minutes à 95°C
- Stocker les échantillons à -20°C.

16. HYBRIDATION D'ADN CIBLES BIOTINYLES

16.1. Principe

Les ADN cibles biotinylés issus de la transcription inverse d'ARN messenger sont mélangés à une solution d'hybridation (AAT, Belgium) et déposés dans des chambres d'hybridation délimitant chaque damier. Les chambres d'hybridation sont fermées à l'aide de couvres-objets en plastique et les lames sont placées dans un four à 60°C pendant une nuit. Au cours du passage au four, les ADN cibles s'hybrident spécifiquement à leur trappeur anti-complémentaires et ce grâce à la capacité que possède l'ADN dénaturer de se réassocier à sa séquence complémentaire quand les conditions (température, force ionique,...) sont adéquates. Ce type de réactions comprend deux étapes. La première étape est la nucléation. L'ADN forme des noyaux de double brin apparié au hasard des collisions. Ces noyaux d'ADN double brin se font et se défont jusqu'au moment où les deux brins d'ADN, liés par endroit par des noyaux de nucléation, sont parfaitement alignés. Dans un second temps, il se produit un appariement rapide des deux brins d'ADN formant alors une double hélice. L'étape de nucléation, par ses désappariement répétés, nécessite de l'énergie, d'où l'utilité du passage au four. La température de chauffage doit être suffisamment élevée pour permettre la nucléation, mais pas trop importante afin que les deux brins d'ADN puissent s'hybrider.(Figure II.1). A la sortie du four, les lames sont lavées avec une solution de tampon B1 0,1X + Tween 0,1%, afin d'éliminer les ADN cibles ne s'étant pas hybridés.

16.2. Matériel

- Lames de verre spottées;
- HybriBuffer A (AAT, Namur, Belgique);
- HybriBuffer B (AAT, Namur, Belgique);

- Produits de RT;
- ADN cible pour contrôle positif 50 nM;
- Chambres d'hybridation (AAT, Namur, Belgique);
- Boîtes de pétri 92*16 mm W/O CAMS (SARSTEDT, Nümbrecht, Allemagne);
- Acide Malique (Merck, Darmstadt, Allemagne);
- NaCl (Merck, Darmstadt, Allemagne);
- Hydroxyde de Sodium en pastille (Merck, Darmstadt, Allemagne);
- NaOH (1M) (Merck, Darmstadt, Allemagne);
- Tween 20 (Sigma, St Louis, USA);

16.3. Méthode

16.3.1. Hybridation

- Préparation du mixe d'hybridation :

- Pour une chambre d'hybridation :
 - HybriBuffer A : 6,5 μ l
 - HybriBuffer B : 26 μ l
 - Produit de RT : 20 μ l
 - Contrôle positif : 10 μ l
 - Eau distillée : 2,5 μ l

- Placer les chambres d'hybridation autour de chaque damier;
- Déposer 65 μ l du mixe d'hybridation par chambre;
- Fermer les chambres d'hybridation avec un couvre objet en plastic;
- Placer chaque lame dans une boîte de pétri vide
- Placer le tout au four préchauffé à 60°C pendant une nuit.

16.3.2. Lavages post-hybridation

* Préparation du tampon B1 1X :

- Dissoudre dans de l'eau distillée :
 - Acide Malique 0,1 M
 - NaCl 0,150 M
- Porter à pH 6,5-7,0 avec des pastilles d'hydroxyde de Sodium
- Utiliser une solution de NaOH 1M pour monter jusqu'à pH 7,5

- A la sortie du four, enlever les chambres d'hybridation;
- Laver quatre fois les lames avec le tampon B1 0,1X + Tween 0,1%;
- Passer immédiatement à l'étape de révélation.

17. DETECTION DES ADN CIBLES

Lors de la réaction d'amplification par PCR ou de la transcription inverse, les ADN cibles sont marqués par l'incorporation de dUTPs biotinylés. La cible hybridée à son trappeur est révélée par un conjugué anticorps anti-biotine-Cyanine3. La Cyanine3 couplée à l'anticorps lié à la biotine est mise en évidence par un scanner confocal. La cyanine3 est excitée par le laser et la lumière émise par le fluorochrome est reprise par un photodétecteur relié à un ordinateur. On obtient ainsi une image digitalisée des spots, dont l'intensité, proportionnelle à la quantité de cibles hybridées, est représentée par une échelle de couleurs artificielles. Après la révélation, les spots sont quantifiés par outils informatiques.

17.1. Matériel

- Tampon B1 1X (préparation cf. 16.3.2.)
- Gloria (Nestlé, Suisse);
- Conjugué anticorps anti-biot-cy3 (Sigma, St Louis, USA);
- GMS 418 Array Scanner (Genetic MicroSystems, USA);
- Ordinateur Pentium II (Dell, USA);
- Programme d'analyse GMS 418 (Genetic MicroSystems, USA);
- Parafilm (Stabilo, Allemagne).

17.2. Méthode

* Préparation de la solution tampon B1 1X + Gloria :

- Dissoudre 0,1% de gloria dans du tampon B1 1X (800 μ l par lame)

* Préparation de la solution anti-biotine-cyanine3 (à l'abrit de la lumière):

- Diluer 1000 fois la solution stock d'anticorps dans la solution de tampon B1 1X+Gloria

- Dispenser sur un parafilm 800 μ l par lame de conjugué anti-biotine-cy3 dilué;

- Disposer les lames, damiers vers le conjugué, sur le parafilm;
- Incuber 45 minutes à température ambiante;
- Laver 5 fois les lames avec le tampon B1 0,1X + Tween 0,1 %, pendant 2 minutes;
- Laver 2 fois les lames avec de l'eau distillée pendant 2 minutes;
- Laisser sécher à température ambiante;
- Scanner les lames et quantifier.

18. Quantification

Après avoir scanner les lames, les images obtenues, enregistrées en format 16 bit, sont quantifiées avec le programme "Imagene" (Biodiscovery, Californie, USA). Ce dernier permet de déterminer la moyenne des intensités de chaque pixel à l'intérieur d'un spot. Les valeurs obtenues par l'intermédiaire de ce programme vont permettre de déterminer après normalisation, la variation d'expression de gènes d'une situation test par rapport à une situation contrôle.

18.1. Matériel

- Ordinateur pentium II (Dell, USA) ;
- Programme Imagène (Biodiscovery, Californie, USA)
- Programme Excell 2000 (Microsoft, USA).

18.2. Méthode

18.2.1. Quantification

- Lancer le programme Imagène ;
- Ouvrir le fichier image correspondant au damier à quantifier ;
- Définir une grille grâce à l'option "grid" (Définir le nombre de lignes et de colonnes, la taille minimale et maximale des spots) ;
- Cliquer successivement sur chaque spot au quatre coins du damier (Figure) ;
L'ordinateur trace alors la grille;
- Déplacer la grille (à l'aide des options adéquates) de manière à ce que chaque spot soit bien à l'intérieur d'un cercle de cette grille ;
- Cliquer sur le bouton « Auto Adjust ». Les cercles s'ajustent aux mieux à chaque spot. Les cercles qui ne sont pas correctement centrés sur un spot, sont déplacés

- individuellement à l'aide des options spécifiques ;
- Une fois que chaque cercle à été bien défini pour chaque spot, appuyer sur le bouton « Quantify » de l'onglet "measurement". L'ordinateur génère un tableau récapitulatif reprenant l'ensemble des valeurs de quantification.

18.2.2. Traitement des données

Dans le tableau de chiffres obtenu, ne sont considérées que les valeurs des colonnes "Signal Mean" et "Background Mean".

Les valeurs de background sont soustraites aux valeurs de signal. Pour chaque groupe de trois spots correspondant à un gène, la moyenne des valeurs obtenues est réalisées.

Pour la suite du traitement des données, il n'est considéré que les moyennes présentant des valeurs supérieures à 2,5 fois le bruit de fond.

L'ensemble des opérations des points 18.2.1 et 18.2.2 sont réalisées pour chaque damier aux différents gains de "scanning".

18.2.3. Détermination de la variation d'expression de gène d'une situation test par rapport à un contrôle

Chaque valeur moyenne test est divisée par la valeur moyenne contrôle correspondante. Ce rapport est réalisé entre des valeurs correspondant à un même gène et ayant été obtenues pour des damiers ayant été scannés à un gain identique.

La moyenne de ces différents rapports pour chaque gène est ensuite réalisée. Celle-ci ne prend en compte que les valeurs des rapports correspondant à une situation de non saturation.

Une normalisation de la transcription inverse, de l'hybridation et de la révélation est réalisée par l'intermédiaire des standard internes afin de réduire les possibles variations de ces étapes. Une seconde normalisation pour l'ensemble du damier est enfin réalisée par les « housekeeping gene » afin de réduire les variations biologiques entre les damiers. Les valeurs obtenues correspondent à des variation d'expression de gènes. Les valeurs supérieures à 1 correspondent à une augmentation de l'expression du gène considérée par rapport au contrôle. Les

valeurs comprises entre 0 et 1 correspondent à une diminution d'expression de gène. La valeur de cette diminution est définie par l'inverse négative de la valeur de normalisation globale comprise entre 0 et 1.

III. Résultats et Discussions

I. Première Partie : Elaboration du microdamier

Rappelons que ce travail s'inscrit dans le cadre d'une recherche visant à préciser le rôle des monocytes dans les étapes précoces de l'athérogenèse. C'est pour cela que ce travail sera consacré à établir un nouvel outil moléculaire, pour suivre l'expression des gènes dans des monocytes soumis à des conditions pro-athérogènes. Ce mémoire comportera donc deux parties d'intérêts : l'élaboration du microdamier et ensuite son utilisation pour tester les effets de conditions pro-athérogènes sur des monocytes THP-1 en culture.

1. Recherche de clones

Comme décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes, cette recherche est réalisée à partir d'une liste prédéfinie de gènes d'intérêts. Dans le cadre de ce mémoire, la liste de gènes présentée au Tableau III.1.1 et III.1.2, a été établie pour les raisons expliquées dans l'introduction. L'ensemble des séquences d'ARN messenger de ces gènes ont été trouvées avec succès dans les banques de séquences humaines de gènes reprises sur le site du NCBI. Les clones correspondant à ces séquences ont été trouvés dans la banque RZPD, chez qui ils ont été commandés, à l'exception des clones correspondant à l'interleukine 8 et à la cyclooxygénase 2 humaine. Ces deux clones ne satisfaisant pas aux critères de sélection, n'ont pas été commandés. Parmi l'ensemble des gènes choisis, quatre ont fait l'objet d'une recherche personnelle (CD36, MSR1, THBD, TF) et l'ensemble des étapes menant à la réalisation du microdamier pour ces quatre gènes, a été mené à bien dans le cadre de ce travail. Les autres clones étaient soit déjà présents au laboratoire (CCR2), soit recherchés par le personnel de la société AAT. Pour l'ensemble des gènes, les recherches ont été effectuées selon un protocole commun et des critères de sélections identiques (voir Matériels et Méthodes Point 1).

Gènes	Abréviations	Fonctions principales
Actine bêta	ACTB	Housekeeping gene
Antigène CD36 (Récepteur au collagène type I, Récepteur à la thrombospondine)	CD36	Adhésion cellulaire, Endocytose de macromolécules dont LDL oxydées
Chémokine récepteur 2 (C-C motif) isoforme A	CCR2A	Chémotactisme
Facteur de coagulation III (Thromboplastine, Facteur Tissulaire)	TF	« Coagulation »
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPD	Housekeeping gene
Intégrine bêta 2	CD18	Rolling et transmigration
Interleukine 1 bêta	IL1B	Inflammation
Interleukine 6	IL6	Inflammation
Interleukine 8	IL8	Inflammation
L-Sélectine	LSEL	Rolling et transmigration
Macrophage Scavenger receptor 1	MSR1	Endocytose de macromolécules dont LDL oxydées
<u>Peroxisome proliferative activated receptor, alpha</u>	PPARA	Facteur de transcription
Peroxisome proliferative activated receptor, gamma	PPARG	Facteur de transcription
Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	COX2	Inflammation
Thrombomoduline	THBD	« Coagulation »
Tumor Necrosis Factor alpha	TNF α	Inflammation

Tableau III.1.1 : Liste des gènes définie pour la réalisation du micro-damier (classement par ordre alphabétique des gènes)

Gènes	Abréviations	Fonctions principales
Facteur de coagulation III (Thromboplastine, Facteur Tissulaire)	TF	« Coagulation »
Thrombomoduline	THBD	« Coagulation »
Antigène CD36 (Récepteur au collagène type I, Récepteur à la thrombospondine)	CD36	Adhésion cellulaire, Endocytose de macromolécules dont LDL oxydées
Chémokine récepteur 2 (C-C motif) isoforme A	CCR2A	Chémotactisme
Macrophage Scavenger receptor 1	MSR1	Endocytose de macromolécules dont LDL oxydées
<u>Peroxisome proliferative activated receptor, alpha</u>	PPARA	Facteur de transcription
Peroxisome proliferative activated receptor, gamma	PPARG	Facteur de transcription
Actine bêta	ACTB	Housekeeping gene
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPD	Housekeeping gene
Interleukine 1 bêta	IL1B	Inflammation
Interleukine 6	IL6	Inflammation
Interleukine 8	IL8	Inflammation
Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	COX2	Inflammation
Tumor Necrosis Factor alpha	TNF α	Inflammation
Intégrine bêta 2	CD18	Rolling et transmigration
L-Sélectine	LSEL	Rolling et transmigration

Tableau III.1.2 : Liste des gènes définie pour la réalisation du micro-damier (classement par fonctions principales)

<u>Echantillons</u>	<u>Concentrations</u>
ACTB	83 ng/ μ l
CD36	3600 ng/ μ l
CCR2A	960 ng/ μ l
TF	2500 ng/ μ l
GAPD	33 ng/ μ l
CD18	790 ng/ μ l
IL1B	56 ng/ μ l
IL6	27 ng/ μ l
LSEL	875 ng/ μ l
MSR1	3300 ng/ μ l
PPARA	37 ng/ μ l
PPARG	36 ng/ μ l
THBD	3000 ng/ μ l
TNFa	31 ng/ μ l

Tableau III.2 : Tableau récapitulatif reprenant pour les différents gènes cibles les concentrations en ADN plasmidique, déterminées par spectrophotométrie, après extraction plasmidique.

2. Préparation des plasmides

2.1. Culture des clones sur milieu solide Luria Bertani

Ce mode de culture permet l'obtention de colonies isolées de clones bactériens.

L'antibiotique contenu dans le milieu permet la sélection positives des bactéries d'intérêt. Celles-ci, reçues en suspension dans du glycérol, sont remises en culture sur milieu solide Luria Bertani. L'antibiotique contenu dans le milieu de culture permet la sélection positive des bactéries d'intérêt. Pour l'ensemble des clones bactériens, nous avons obtenu avec succès des colonies isolées

2.2. Culture bactérienne en milieu liquide

Ce mode de culture fait appel aux colonies isolées de clones bactériens obtenues sur milieu solide. Une seule colonie isolée est considérée par échantillon de culture liquide. Ceci permet l'obtention en grande quantité d'un seul clone bactérien. De la sorte, lors du séquençage, la séquence finale obtenue sera celle d'un clone unique pour lequel on pourra confirmer de manière certaine la présence de l'insert d'intérêt recherché. Pour chaque colonie isolée, il a été obtenu avec succès une culture bactérienne liquide.

2.3. Extraction d'ADN plasmidique

L'ADN plasmidique, produit en grande quantité par la multiplication en grand nombre des clones bactériens en culture liquide, est extrait par lyse cellulaire, puis purifié et concentré. Les concentrations suivantes en ADN ont été obtenues après quantification par spectrophotométrie (Tableau III.2).

2.4. Séquençage

Afin de s'assurer que l'ADN plasmidique extrait contient bien la séquence d'intérêt qui sera amplifiée par PCR, les échantillons d'ADN issus de la mini-préparation sont séquencés. Ce séquençage est réalisé au département de neurobiologie aux FUNDP. Les séquences obtenues à partir du séquençage, sont alignées à leur séquence « théorique » de la banque de clones RZPD, afin de s'assurer que celles-ci sont bien identiques, ce qui a été le cas pour tous les gènes cibles (Tableau III.3).

Gènes	Abréviations	Séquençage
Actine bêta	ACTB	✓
Antigène CD36 (Récepteur au collagène type I, Récepteur à la thrombospondine)	CD36	✓
Chémokine récepteur 2 (C-C motif) isoforme A	CCR2A	✓
Facteur de coagulation III (Thromboplastine, Facteur Tissulaire)	TF	✓
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPD	✓
Intégrine bêta 2	CD18	✓
Interleukine 1 bêta	IL1B	✓
Interleukine 6	IL6	✓
L-Sélectine	LSEL	✓
Macrophage Scavenger receptor 1	MSR1	✓
<u>Peroxisome proliferative activated receptor, alpha</u>	PPARA	✓
Peroxisome proliferative activated receptor, gamma	PPARG	✓
Thrombomoduline	THBD	✓
Tumor Necrosis Factor alpha	TNF α	✓

Tableau III.3 : Résultats du séquençage. Les clones pour lesquels la séquence attendue a bien été obtenue, sont suivis du signe ✓

Gènes	Séquences des primers	T°m.
CCR2	SENS : TCGCAGATGTCCTTGATGCTCAT ASENS: GGATCATACAAATATATGAAGGTGAA	68°C
CD18	SENS : AGACAAGGCCGTCAGGACCCA ASENS : ATAATTAATGGGATGTCATTTTATACC	68°C
CD36	SENS : TGTATAGATTTGTTCTTCCATCC ASENS: CAAACATCACCACACCAACAC	62°C
GAPDH	SENS :TGCCCTCAACGACCACTTT ASENS :GGTTGAGCACAGGGTACTT	58°C
IL1 β	SENS:AGGGTAGTGCTAAGAGGATC ASENS:GATCCTCTTAGCACTACCCT	60°C
IL6	SENS:GACAACTCATCTCATTCTGC ASENS:TACCTCAAATAAATGGCTAACT	58°C
L-Sélectine	SENS : GCCTGCGCTGTTTTTTAGTTTGG ASENS :TTATTCAAATGCAAAATTGCATGTTAC	68°C
MSR1	SENS: AGGGGAAAAGGGGAGTGGA ASENS: GAGCAGCGATTTCATAGTTGT	60°C
PPAR α	SENS:GGCGAGGATAGTTCTGGAAGC ASENS:TCTGAGAAAGCAAAACTGAAAGCA	66°C
PPAR γ	SENS:ACGACCAAGTAACTCTCCT ASENS:ACAGACCTCAGACAGATTGT	56°C
β -ACTINE	SENS:TGGAACGGTGAAGGTGACAG ASENS:CACTTTTATTCAACTGGTCTCAA	62°C
TF	SENS : GGGTGCATTTCTAGGACTT ASENS : TTTACAATTCCCAGTCACCT	56°C
THBD	SENS : CTTAATCAGGTCCTCAGAGAA ASENS: TTCCATACACTGAAGCAGGAT	60°C
TNF α	SENS : TTTCCAGACTTCCTTGAG ASENS : CTTTATTCTCGCCACTG	52°C

Tableau III.4 : Liste des amorces sens et anti-sens (ASENS) utilisées pour la réalisation des PCR. Pour chaque couple d'amorces, la température de melting (T°m) est indiquée).

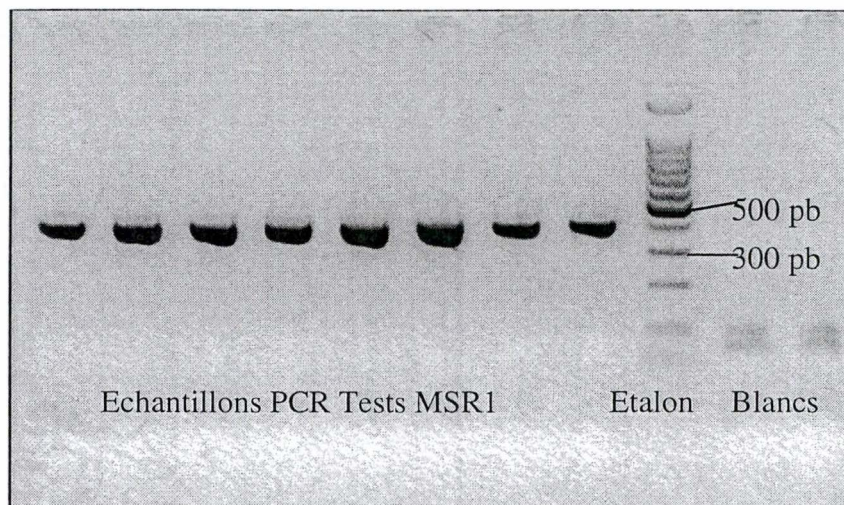


Figure III.1 : Gel d'agarose (2%) sur lequel huit échantillons PCR Tests MSR1 ainsi que les blancs qui leur sont associés, ont été déposés pour migration. Un marqueur de poids moléculaire (Etalon) permet d'évaluer la taille des fragments d'ADN obtenus par PCR. 10 μ l de produits PCR auxquels étaient associés 2 μ l de bleu de chargement ont été déposés par puits (Tests et Blancs). Pour l'étalon, on dépose 10 μ l de marqueur de poids moléculaire. L'ensemble des produits déposés sur le gel a migré pendant une heure à 120 V. Pour chaque échantillon PCR tests MSR1, on a obtenu une bande d'environ 400 pb. Au niveau des blancs, on observe des bandes d'une longueur inférieure à 100 pb correspondant à des dimères d'amorces et des amorces libres. Il s'agit d'une image en « négatif » du gel.

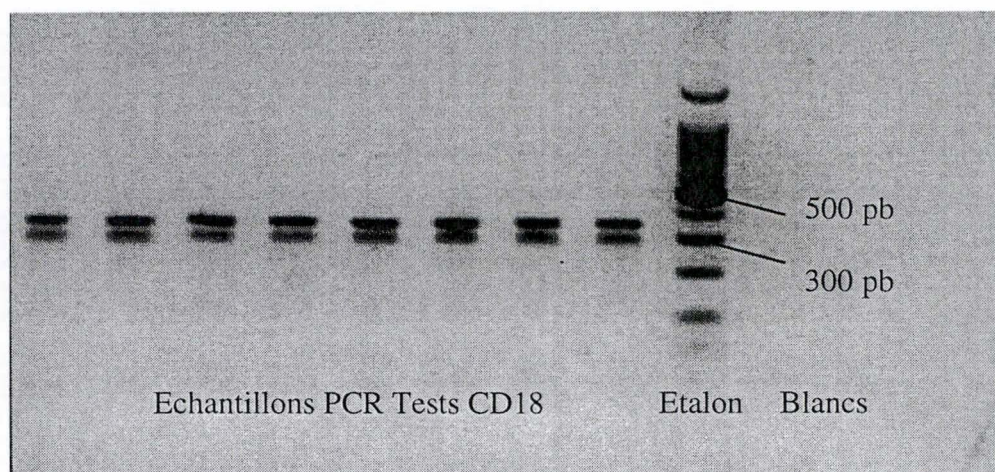


Figure III.2 : Gel d'agarose (2%) sur lequel huit échantillons PCR Tests CD18 ainsi que les blancs qui leur sont associés, ont été déposés pour migration. Un marqueur de poids moléculaire (Etalon) permet d'évaluer la taille des fragments d'ADN obtenus par PCR. 10 μ l de produits PCR auxquels étaient associés 2 μ l de bleu de chargement ont été déposés par puits (Tests et Blancs). Pour l'étalon, on dépose 10 μ l de marqueur de poids moléculaire. L'ensemble des produits déposés sur le gel a migré pendant une heure à 120 V. Pour chaque échantillon PCR tests CD18, on a obtenu une bande d'environ 400 pb correspondant à la bande attendue. La seconde, d'environ 300 pb correspond à la bande parasite. Au niveau des blancs, aucune bande n'est observable. Il s'agit d'une image en « négatif » du gel.

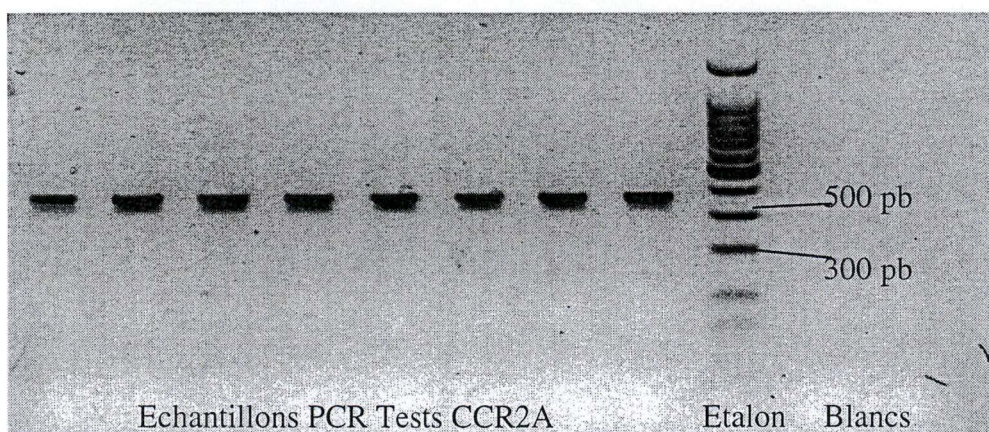


Figure III.3 : Gel d'agarose (2%) sur lequel huit échantillons PCR Tests CCR2A ainsi que les blancs qui leur sont associés, ont été déposés pour migration. Un marqueur de poids moléculaire (Etalon) permet d'évaluer la taille des fragments d'ADN obtenus par PCR. 10 μ l de produits PCR auxquels étaient associés 2 μ l de bleu de chargement ont été déposés par puits (Tests et Blancs). Pour l'étalon, on dépose 10 μ l de marqueur de poids moléculaire. L'ensemble des produits déposés sur le gel a migré pendant une heure à 120 V. L'ensemble des produits déposés sur le gel a migré pendant une heure à 120 volt. Pour chaque échantillon PCR tests CCR2, on a obtenu une bande d'environ 400 pb correspondant à la bande attendue. La seconde, de taille à peine inférieure, correspond à la bande parasite. Au niveau des blancs, aucune bande n'est observable.

Il s'agit d'une image en « négatif » du gel.

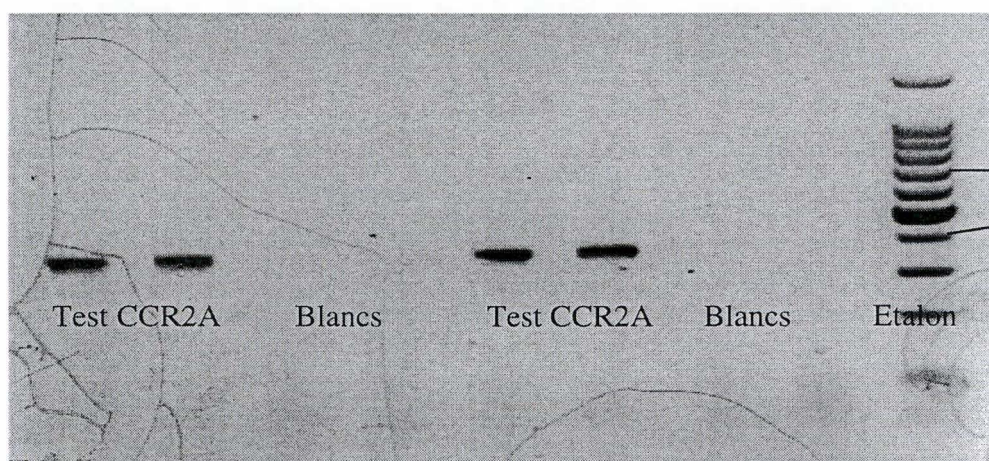
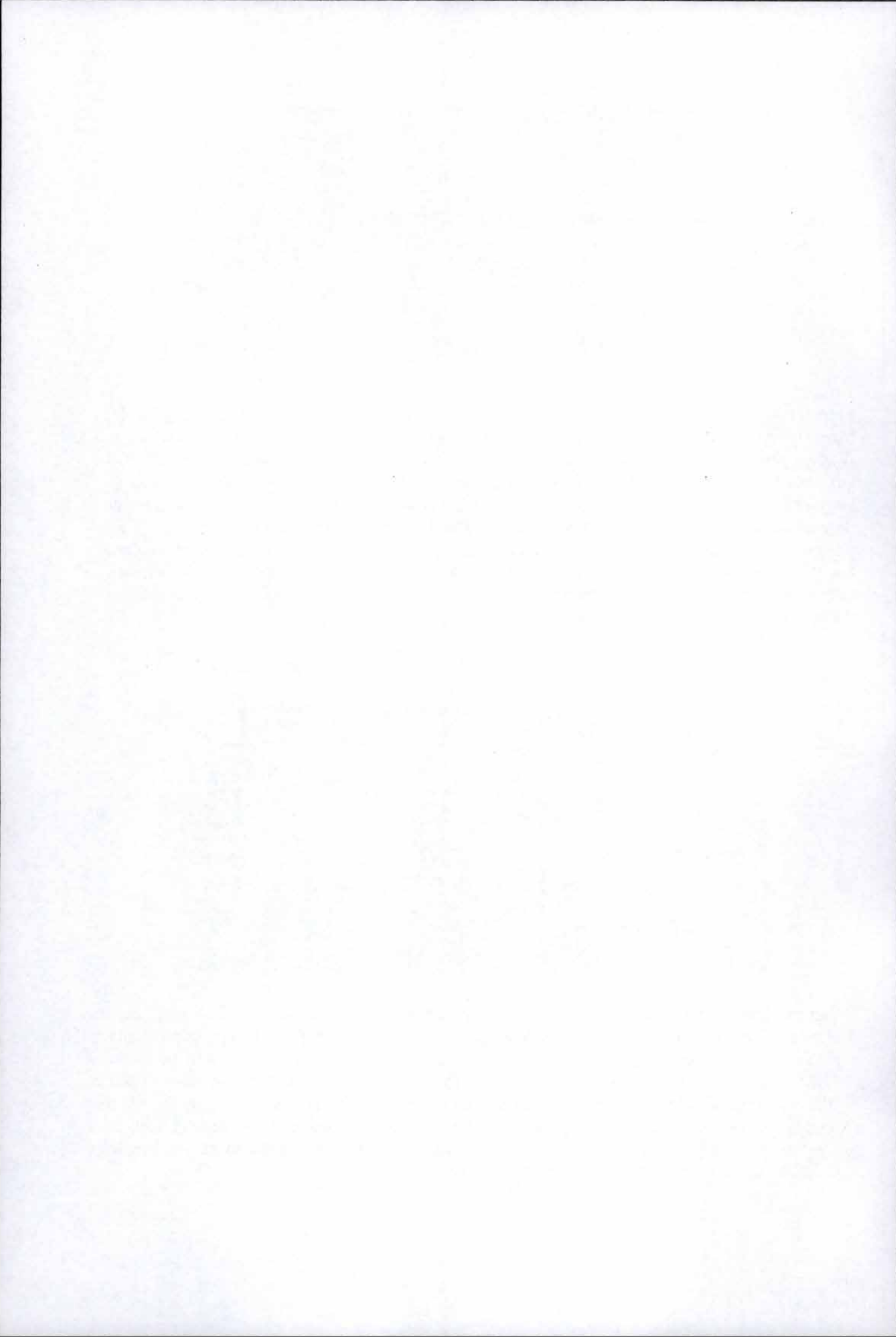


Figure III.4 : Gel d'agarose (2%) sur lequel huit échantillons PCR Tests CCR2A ainsi que les blancs qui leur sont associés, ont été déposés pour migration. Un marqueur de poids moléculaire (Etalon) permet d'évaluer la taille des fragments d'ADN obtenus par PCR. 10 μ l de produits PCR auxquels étaient associés 2 μ l de bleu de chargement ont été déposés par puits (Tests et Blancs). Pour l'étalon, on dépose 10 μ l de marqueur de poids moléculaire. L'ensemble des produits déposés sur le gel a migré pendant une heure à 120 V. Aucune bande secondaire parasite n'est observable. Au niveau des blancs, aucune bande n'est observable au niveau des tests CCR2A. Il s'agit d'une image en « négatif » du gel.



3. Amplification des ADN cibles par PCR

3.1. Définition des amorces

Pour chaque séquence à amplifier, il a été défini une amorce sens et anti-sens, selon le protocole repris au point 4.2 des Matériels et Méthodes.

La liste de ces amorces ainsi que leurs caractéristiques sont reprises dans le tableau III.4.

3.2. PCR « tests »

Avant d'initier la production de trappeurs en grande quantité par PCR, il est important de s'assurer de la fonctionnalité de la réaction dans les conditions standard qui ont été définies (voir Matériels et Méthodes Points 4.3 et 4.4). Pour cela, on réalise des PCR préliminaires, appelées PCR « tests » faisant intervenir un nombre limité d'échantillons (8 tubes tests + 2 blancs). Pour la plupart des tests PCR réalisés, dans les conditions standards, nous avons obtenu, après mise sur gel des échantillons PCR (8 tests + 2 blancs), une bande de taille attendue (environ 400 pb) de bonne intensité avec des blancs PCR négatifs. Ceci est illustré, en guise d'exemple, pour les PCR tests réalisées dans le cas des amplicons obtenus pour le gène MSR1 dans la figure III.1. Cependant, des problèmes sont survenus pour les produits PCR CCR2A et CD18. Pour ces derniers, apparaissent des bandes secondaires parasites de faible intensité, sous la bande attendue. Cette bande parasite, correspondant à environ 300 bp, apparaissait de manière récurrente pour les échantillons PCR CD18 (Figure III.2). La présence de cette bande secondaire a rendu inutilisable les échantillons PCR pour la suite de l'élaboration du microdamier, car la spécificité des spots pour une séquence unique n'était plus garantie. Aucun échantillon PCR CD18 n'a pu être utilisé. Par contre, pour les échantillons PCR CCR2A, nous avons observé une bande parasite de manière sporadique (Figure III.3). Les échantillons PCR CCR2A ne présentant pas cette bande parasite (Figure III.4), ont pu être conservés pour la suite des opérations requises pour l'élaboration du microdamier.

La nature de ces bandes parasites n'a pas pu être déterminée. L'hypothèse a été émise qu'il pourrait s'agir de produits PCR de même nature que ceux attendus, mais générant des structures secondaires les condensant et entraînant une migration plus rapide dans le gel par rapport aux produits attendus. Il pourrait également s'agir de produits PCR

Gènes	Longueur des trappeurs	Résultats
CCR2	359	✓
CD36	503	✓
GAPDH	308	✓
IL1 β	439	✓
IL6	412	✓
L-Sélectine	397	✓
MSR1	393	✓
PPAR α	437	✓
PPAR γ	402	✓
β -ACTINE	439	✓
TF	364	✓
THBD	427	✓
TNF α	400	✓

Tableau III.5 : Résultats des PCR de production. Le symbole « ✓ » indique que les trappeurs ont bien la taille attendue.

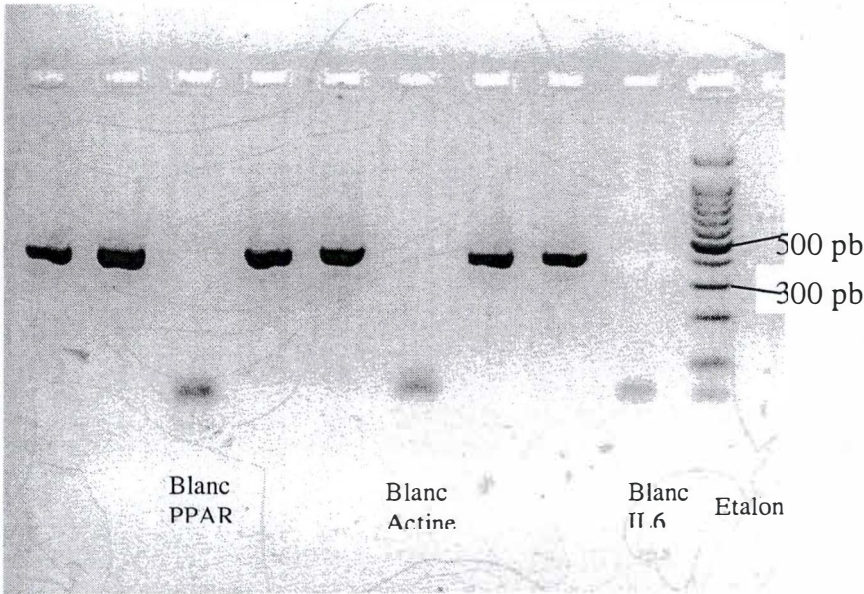


Figure III.5 : Gel d’agarose (2%) sur lequel deux échantillons de cibles biotinylées PPARA, Actine bêta et interleukine 6 (IL6) ainsi que le blanc qui leur est associé, ont été déposés pour migration. Un marqueur de poids moléculaire (Etalon) permet d’évaluer la taille des fragments d’ADN obtenus par PCR. 10µl de produits PCR auxquels étaient associés 2 µl de bleu de chargement (Tests et Blanc), ont été déposés par puits. Pour l’étalon, on a déposé 10µl de marqueur de poids moléculaire. L’ensemble des produits déposés sur le gel a migré pendant une heure à 120 V. Pour chaque PCR de cibles biotinylées, on a obtenu des fragments d’ADN de taille attendue. Au niveau des blancs, on observe une bande d’une longueur inférieure à 100 pb correspondant à des amorces libres. Il s’agit d’une image en « négatif » du gel.

incomplètement finis lors de l'étape de terminaison. La recherche d'un nouveau clone CD18 par l'équipe AAT, sa commande, sa production ainsi que l'extraction d'ADN et la vérification de la présence de la séquence d'intérêt par séquençage a pris un temps important. Les trappeurs CD18 n'ayant jamais pu être prêts pour la date de spotting qui avait été programmée, nous avons dû nous résoudre à supprimer provisoirement sa présence sur le premier microdamier prototype dans le cadre de ce mémoire.

3.3. PCR de production

La fonctionnalité de la PCR pour chaque séquence d'intérêt ayant été vérifiée, nous avons réalisé des PCR de production permettant de produire en quantité importante les trappeurs. Tous les trappeurs ainsi produits ont bien la taille attendue (Tableau III.5).

3.4. Production des cibles biotinylées

En parallèle aux PCR de production, nous avons produits par PCR des cibles biotinylées en quantité réduites (200 μ l). Celles-ci ont été obtenues par incorporation compétitive de dUTP biotinylé (10 μ M final) par rapport à des dTTP (150 μ M final) présents dans le mélange réactionnel et ce, selon le protocole standard de PCR repris dans la partie Matériels et Méthodes. Ces cibles biotinylées double brin serviront à tester la spécificité du microdamier après l'étape de « spotting ».

Aucun problème n'a été rencontré pour la production de celles-ci, comme illustré à la figure III.5 pour les cibles biotinylées correspondant à PPAR alpha, l'actine bêta et l'interleukine-6. Mais des résultats similaires ont été obtenus pour l'ensemble de cibles biotinylées.

3.5. Purification des produits PCR

L'ensemble des produits PCR a été purifié afin d'éliminer les amorces aminées qui n'ont pas réagi lors de la PCR. Ceci permet d'éviter une compétition entre les trappeurs et les amorces aminées pour la fixation au support. De la sorte, chaque spot sera homogène et les variations de signal entre spots pourront être comparées. Les cibles biotinylées ne devant pas être fixées au support fonctionnalisé, ne requièrent pas cette étape de purification.

Trappeurs	Concentration (nM)
CCR2A	646
L-SEL	611
TF	893
THBD	645
MSR1	2556
CD36	1946
TNF α	580
IL1 β	1270
IL6	828
PPAR α	3330
PPAR γ	1597
ACTINE- β	3594
GAPDH	1533

Tableau III.6 : Concentration des trappeurs d'ADN double brin (nM) après purification et concentration des produits PCR, pour les différents gènes cibles.

3.6. Concentration des produits PCR

Les produits PCR purifiés sont concentrés par réduction du volume de solvant dans lequel ils se trouvent (voir Matériels et Méthodes Point 7). Cette étape est un prérequis pour satisfaire aux conditions de spotting exigeant une concentration finale en trappeur de 300 nM. Nous nous limitons donc à une seule étape de quantification par produit PCR, à ce stade de la procédure.

3.7. Quantification des produits PCR

Les produits PCR, devant être spottés à une concentration finale de 300 nM, exigent d'être à une concentration initiale, avant préparation de la solution de spotting, d'environ 600 nM ou supérieure. La détermination de la concentration initiale des trappeurs est réalisée à l'aide d'un agent intercalant pour acides nucléiques double brin. Ce dernier, en s'intercalant entre les bases de la double hélice d'ADN, devient excitable à 480 nm et la fluorescence émise est proportionnelle à la quantité d'ADN double brin. La conversion des valeurs de fluorescence en valeurs de concentration fait intervenir une droite d'étalonnage. Celle-ci est établie à partir d'une solution d'ADN double brin de concentration connue qui est diluée de façon appropriée (voir Matériels et Méthodes Point 8.2.c). Les concentrations finales, exprimées en nM pour les différents trappeurs sont reprises dans le tableau III.6. Elles varient entre 611 nM (pour les trappeurs L-sélectine) et 3594 nM (pour les trappeurs actine-bêta). Nous disposons donc de solutions suffisamment concentrées pour pouvoir lancer l'étape suivante, le spotting.

4. Spotting

4.1. Design du damier

Dans le cadre de ce mémoire, le damier suivant a été réalisé (Figure III.6). Outre les spots constitués d'ADN trappeurs caractéristiques de l'étude d'expression de gènes qui est menée (Tableau III.1), on y retrouve d'autres spots particuliers. Parmi ceux-ci, on distingue tout d'abord des **contrôles de fixation**. Ils permettent de s'assurer de la bonne fixation des ADN trappeurs au support fonctionnalisé lors du spotting. Ils sont de nature exogène par rapport au modèle d'étude et présentent des nucléotides biotinylés permettant leur révélation directe sans besoin d'un appariement de cibles anti-complémentaires biotinylées. Pour l'élaboration de ce microdamier, nous avons choisi pour le contrôle de fixation, d'une partie de séquence du cytomégalo virus. Celle-ci a

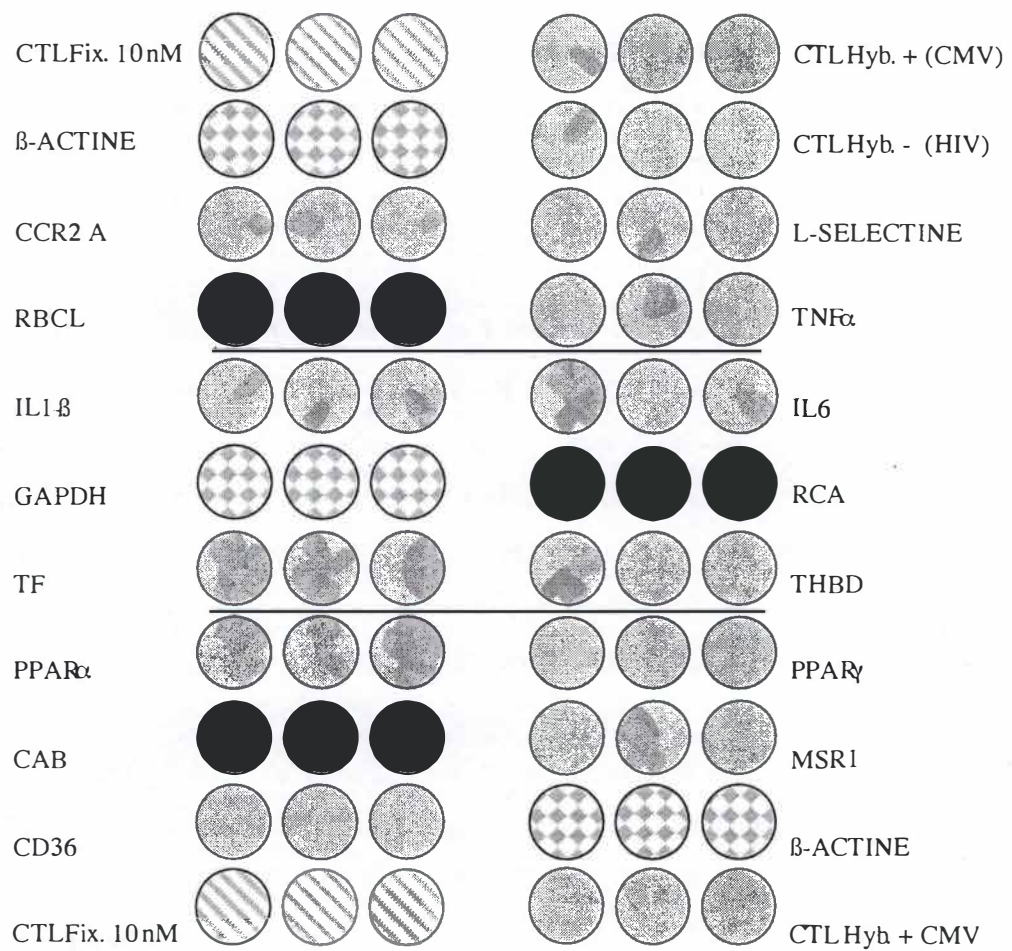


Figure III.6 : Design du micro-damier

été produite par PCR par la société AAT (Namur, Belgique). On y retrouve ensuite, des **contrôles d'hybridation positive**. Ceux-ci sont constitués de trappeurs non biotinylés identiques en séquence aux contrôles de fixation. Ils ont pour fonction de permettre la vérification du bon déroulement de l'hybridation. Des cibles biotinylées anti-complémentaires à ces trappeurs sont ajoutées à chaque solution d'hybridation et doivent s'hybrider à leurs trappeurs spécifiques si l'étape d'hybridation se déroule bien correctement. Des **contrôles d'hybridation négative** sont également présents. Les trappeurs qui les constituent ont de même été produits par la société AAT par PCR à partir de séquences du virus HIV. Ils ont pour fonction la vérification de l'absence de contamination de spotting et de non spécificité de cibles. A ces différents contrôles, viennent s'ajouter **trois standards internes**: CAB, RBCL et RCA. Les trappeurs correspondant à ces spots sont produits à partir d'ADN de végétaux. Leur rôle est primordial pour l'étape de normalisation des données après quantification. De plus, ils permettent de s'assurer du bon fonctionnement de la transcription inverse.

La définition de l'organisation spatiale des spots sur le damier n'est pas anodine. En effet, celle-ci est primordiale pour la quantification et l'analyse des résultats. Chaque trappeur est déposé en triple. Aux coins de chaque damier sont placés les contrôles de fixation et d'hybridation positives. Ceux-ci, devant s'allumer de manière systématique sur chaque damier, permettent de retrouver les spots extrêmes du damier nécessaires à la définition de la grille de quantification. Les standards internes sont placés de telle sorte que chaque zone du damier en présente au moins un. Dans le cas présent, le damier a été divisé en trois régions dont chacune contient un standard interne différent (Figure III.6). De cette façon, on peut effectuer la normalisation des valeurs à un niveau local, permettant de tenir compte d'un micro-environnement pouvant être très différent d'une région à l'autre du damier, par exemple par la présence d'une tache de bruit de fond. Chaque région du damier contient également des trappeurs pour un « housekeeping gene » intervenant dans la normalisation globale des valeurs. Les autres gènes sont regroupés sur le damier en fonction de leur implication cellulaire.

Trappeurs
ACTINE- β
CAB
CCR2A
CD36
GAPDH
IL1 β
IL6
L-SEL
MSR1
PPAR α
PPAR γ
RBCL
RCA
TF
THBD
TNF α

Tableau III.7 : Trappeurs pour lesquels un test de spécificité a été réalisé, grâce à des cibles biotinylées (voir point 3.4).

4.2. Spotting

L'ensemble des trappeurs, purifiés, concentrés et quantifiés vont être spottés selon le processus décrit dans les Matériels et Méthodes (Point 9). Ceux-ci sont spottés à une concentration finale de 300 nM à l'exception des contrôles de fixation (10 nM final) qui n'ont pas de rôle dans la quantification.

5. Tests de spécificité

Après l'étape de spotting, la spécificité du damier doit être vérifiée. Cette étape a pour but de s'assurer que les trappeurs constituant un groupe de trois spots reconnaissent uniquement leur ADN cible. Des réactions croisées seraient dommageables pour l'estimation de la variation d'expression de gènes. Le test de spécificité est réalisé à l'aide d'ADN cible double brin biotinylé produit par PCR. Celui-ci remplace les produits de transcription inverse dans le protocole d'hybridation repris au Point 16 des Matériels et Méthodes. Le mode opératoire suivi est identique à celui décrit au point sus-mentionné, cependant, le temps de passage des lames au four, chauffé à 65°C, est réduit à deux heures. Les ADN cibles mis en exergue dans le test de spécificité sont des ADN double brin. L'hybridation des cibles à leur trappeur anti-complémentaire est permise grâce aux propriétés de la solution « HybriBuffer B ». La spécificité de liaison est assurée par une température de chauffage de 65°C. La réponse attendue étant de type « oui-non » (hybridation spécifique - hybridation non-spécifique), aucune quantification n'est nécessaire. La spécificité a été testée pour les trappeurs repris dans le tableau III.7. Pour chaque ADN cible biotinylé, on utilise un damier, à l'exception des cibles RCA, RBCL et CAB.

Les trappeurs pour ces trois cibles ont déjà été largement utilisés au laboratoire et la spécificité inter-standards internes n'est plus à démontrer. Dès lors, les ADN cibles biotinylés pour ces trois séquences ont été hybridés sur un même damier. Les résultats des tests de spécificité sont montrés à la figure III.7. L'ensemble des trappeurs ont bien une spécificité unique pour leur cible et aucune réaction croisée n'a été observée.

En résumé, dans cette première partie du travail, nous sommes donc parvenus à produire un damier prototype permettant de suivre l'expression de :

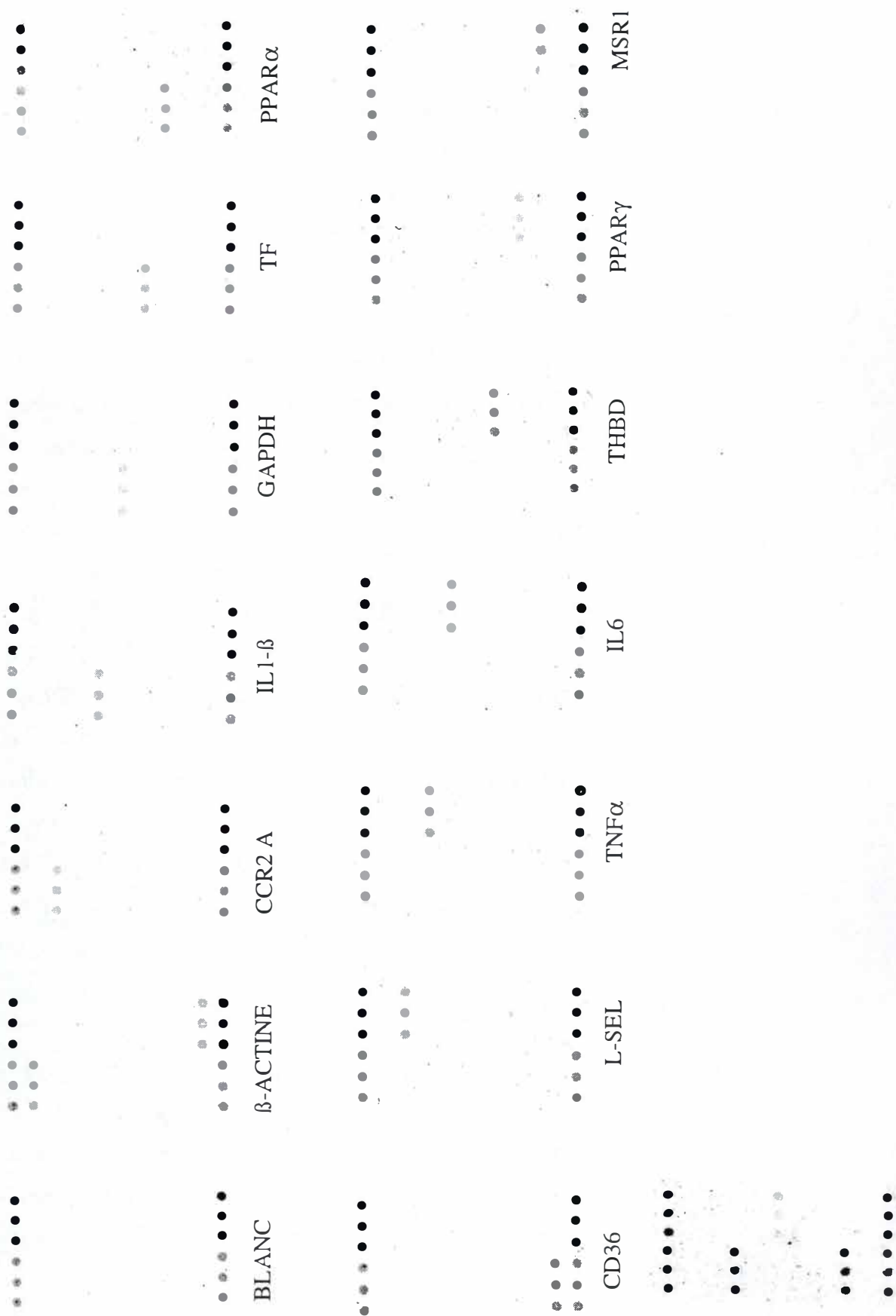


Figure III.7 : Résultats des tests de spécificité. L'hybridation a été réalisée avec 20 μ l de produits PCR biotinylés spécifiques par damier. L'hybridation se fait pendant deux heures à 65°C. Une seule cible biotinylée est hybridée par damier, sauf pour les standards internes.

- deux gènes de maintenance (ou « housekeeping gene »)
- 11 gènes relevant par rapport à la biologie des monocytes / macrophages, par rapport aux 14 gènes initialement prévus, repris dans le Tableau III.1. Pour l'interleukine-8 et la prostaglandine endoperoxyde synthétase 2 (COX2), c'est un problème de clones. Pour CD18, nous avons rencontré un problème de sonde parasite lors des PCR pour amplifier les trappeurs.

Nous avons donc voulu tester ce damier sur des monocytes en culture, les cellules THP-1, soumises ou non à des conditions pro-athérogènes.

II. Utilisation du microdamier

1. Stimulation des cellules THP-1

Dans le cadre de l'étude de l'implication des monocytes dans les étapes précoces de l'athérosclérose, nous avons choisi comme modèle d'étude la lignée pré-monocytaire THP-1. Le LPS est capable d'induire *in vivo* des processus inflammatoires, comparables à ceux impliqués dans les étapes précoces de l'athérosclérose. Nous avons donc stimulé ces cellules au LPS. Cette molécule, caractéristique de la membrane externe des bactéries Gram négatives, est un activateur de premier ordre des cellules du système immunitaire et du déclenchement de l'inflammation. Il va de soi que les processus inflammatoires dans l'athérosclérose impliquent des molécules activatrices différentes du LPS, mais il est important, dans un premier temps, d'établir un patron d'expression de gènes en conditions inflammatoires afin de pouvoir le comparer à celui produit par des molécules pro-athérogènes, telles les LDL, et de définir de la sorte les similitudes et les différences à l'intérieur d'un processus commun. Les conditions de stimulation sont reprises dans la partie Matériels et Méthodes au Point 13. Dans un premier temps, nous avons réalisé des stimulations de 24 heures, ainsi que les contrôles correspondants. Dans un second temps, après analyse des premiers résultats, une cinétique de stimulation a été réalisée pour des temps de 6, 12 et 24 heures, avec leur contrôle respectif. Il est à remarquer que les cellules contrôles ont été traitées de manière identique aux cellules stimulées au LPS, mis à part l'addition de LPS.

2. Extraction d'ARN messenger

L'ARN messenger est extrait des cellules THP-1 selon le mode opératoire décrit dans les Matériels et Méthode au Point 14. Chaque extraction d'ARN messenger a été réalisée sur des cellules contrôles et des cellules stimulées au LPS. La quantité d'ARN messenger extraite par échantillon est évaluée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 260 nm. La quantité de protéines est également déterminée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 280 nm afin d'évaluer la pureté des échantillons en ARN messenger. La pureté des échantillons est considérée comme correcte lorsque le rapport des absorbances est égal ou supérieur à 1,6. Une quantité

	Nombre de cellules	Dilution	Abs 260nm	Abs 280nm	Ratio	Concentration (µg/ml)	Concentration finale (30x) (µg/ml)	Quantité d'ARN messager
CTL 24H (1)	10.10 ⁶	30X	0,198	0,162	1,223	7,9	237	4,1 µg
LPS 24H (1)	10.10 ⁶	30X	0,186	0,155	1,201	7,4	222	4 µg
CTL 6H	11.10 ⁶	30X	0,159	0,107	1,484	6,4	192	3,4 µg
LPS 6H	11.10 ⁶	30X	0,069	0,048	1,440	2,8	84	1,5 µg
CTL 12H	10.10 ⁶	30X	0,089	0,046	1,929	3,6	108	1,9 µg
LPS 12H	10.10 ⁶	30X	0,048	0,029	1,620	1,9	57	1 µg
CTL 24H (2)	11.10 ⁶	30X	0,093	0,056	1,672	3,7	111	1,9 µg
LPS 24H (2)	11.10 ⁶	30X	0,085	0,050	1,688	3,4	102	1,8 µg

Tableau III.8 : Tableau récapitulatif des caractéristiques obtenues pour les préparations d'ARN messager extrait de cellules THP-1 par spectrophotométrie. Les cellules ont été stimulées ou non avec le LPS, pendant 6, 12 et 24 heures.

	Echantillons	Quantité d'ARN messager / RT
Expérience 1	CTL 24H	2 µg
	LPS 24H	2 µg
Expérience 2	CTL 6H	1,5 µg
	LPS 6H	1,5 µg
	CTL 12H	1 µg
	LPS 12H	1 µg
	CTL 24H	1,8 µg
	CTL 24H	1,8 µg

Tableau III.9 : Quantités d'ARN messager, engagées dans l'étape de transcription reverse; pour les différentes préparations d'ARN messager extrait à partir des cellules THP-1, stimulées ou non avec le LPS. Dans l'expérience 1, les cellules ont été stimulées pendant 24 heures. Dans l'expérience 2, elles ont été stimulées pendant 6, 12 et 24 heures.

importante de protéines contaminantes dans les échantillons, caractérisée par un rapport faible, peut poser des problèmes, car cela peut induire des interférences avec la transcription inverse. Pour chaque extraction de l'ARN messenger, des résultats de quantification ont été obtenus. Ils sont consignés dans le tableau III.8. On constate qu'il existe des variations importantes, tant au niveau des ratios, que pour les quantités d'ARN messenger, et ce pour un nombre semblable de cellules. La cause de ces variations n'a pas pu être déterminée, mais elle pourrait trouver son origine dans l'étape d'extraction. La diminution des valeurs d'absorbance des échantillons tests par rapport à leur contrôle dans l'expérience 2, serait peut être due à la stimulation au LPS. L'ensemble des échantillons d'ARN messenger a été soumis à une transcription inverse, bien que certains de ces échantillons présentaient des ratios inférieurs à 1,6.

3. Transcription inverse

Cette étape est réalisée selon le protocole décrit au Point 15 des Matériels et Méthodes. Lors de la transcription inverse, on ajoute aux échantillons d'ARN messenger extrait de cellules THP-1, des ARN messagers d'origine végétale produits *in vitro*. Ceux-ci sont incorporés à des concentrations différentes, afin de pouvoir normaliser les gènes exprimés de manière plus ou moins importante. Au laboratoire, d'autres chercheurs ont montré que la quantité d'ARN messenger optimale à engager dans la transcription inverse est de l'ordre de 2 µg. Cependant, la quantité d'ARN messenger obtenue pour certaines extractions étant limitantes, il nous a fallu reconsidérer cette valeur. En effet, certaines extractions d'ARN messenger ont fourni des quantités de matériel inférieures à 2 µg (voir Tableau III.8). Afin de pouvoir établir le plus précisément les variations d'expression de gènes et pour ce, hybrider des quantités équivalentes d'ADN complémentaire, nous avons pour chaque couple d'échantillons contrôle-test engagé une quantité équivalente d'ARN messenger pour la transcription inverse. De la sorte, même si pour deux expériences, les concentrations en ADN complémentaires hybridés sont différentes, il sera toujours possible de les comparer, car chaque test est rapporté à son contrôle, tout deux impliquant la même quantité de matériel. Pour les transcriptions inverses réalisées, les quantités d'ARN messenger mises en jeu pour chaque échantillon sont reprises dans le tableau III.9.

4. Hybridation d'ADN cibles biotinylés

Le principe et le mode opératoire de cette étape sont décrits au Point 16 des Matériels et Méthodes. L'hybridation est une étape délicate dans l'utilisation du microdamier. En effet, lors de la fermeture des chambres d'hybridation par le couvre-objet en plastique, des bulles peuvent se former. Ces bulles délimitent d'une part des zones dans lesquelles l'hybridation ne se fera pas ou très peu et d'autre part, elles sont responsables de la formation de taches de bruit de fond qui perturberont l'analyse des damiers. La conjonction de ces deux phénomènes peut rendre les damiers inutilisables, comme illustré à la figure III.8. Ces inconvénients peuvent être évités par l'utilisation d'un thermomixer, un appareil agitant les lames par rotation tout en les chauffant. La force centrifuge induite par l'agitation, entraîne la répulsion des éventuelles bulles sur les côtés des chambres d'hybridation. Ceci limite la formation de bruit de fond et de zones de non-hybridation. Les chambres d'hybridation peuvent également perdre leur étanchéité suite au chauffage. La solution d'hybridation s'évapore et entraîne la formation de taches de bruit de fond rendant les damiers non quantifiables. Ce problème peut être limité en enfermant les lames dans des espaces restreints fermés hermétiquement, telles des cassettes spéciales pour hybridation. Cependant, celles-ci sont conçues pour une utilisation dans un four « traditionnel » et ne permettent pas l'utilisation du thermomixer. L'hybridation des échantillons CTL 24H et LPS 24H de l'expérience 1 (Tableau III.9) a été réalisée à l'intérieur d'une cassette. Pour tous les autres échantillons, l'hybridation a été réalisée à l'aide du thermomixer. Les quantités d'ADN complémentaire hybridé pour chaque échantillon correspondent aux quantités d'ARN messenger engagées dans la transcription inverse, reprises dans le tableau III.9.

5. Détection des ADN complémentaires

Les ADN complémentaires cibles biotinylés hybridés à leur trappeur anti-complémentaire, sont mis en évidence par des anticorps anti-biotine couplé à un fluorochrome, la cyanine-3. La liaison spécifique des anticorps à leur cible se fait en présence de poudre de lait Gloria diluée dans le conjugué comme agent bloquant, ce qui permet de masquer des sites de liaison non spécifiques éventuels. La cyanine-3 couplée à l'anticorps est détectée à l'aide d'un scanner confocal. Le fluorochrome est

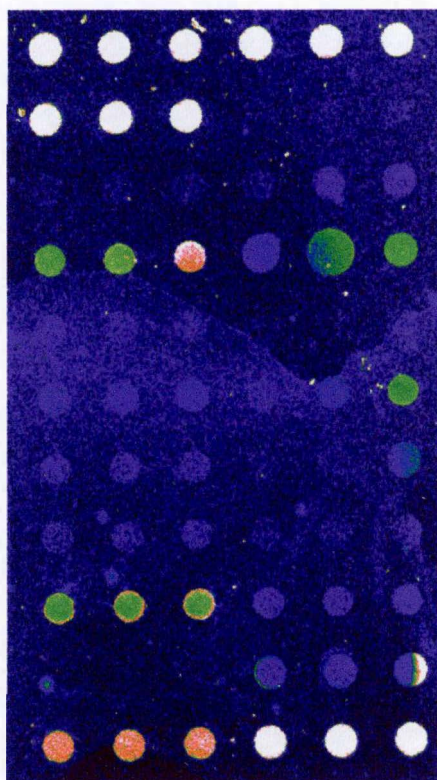


Figure III.8 : Damier pour lequel l'hybridation n'a pas pu se dérouler correctement suite à la présence d'une bulle.

excité par le laser à une longueur d'onde de 515 nm et la lumière émise 555 nm est reprise par un photodétecteur relié à un ordinateur. On obtient une image digitalisée des spots dont l'intensité, proportionnelle à la quantité de cibles hybridées, est représentée par une échelle de couleurs artificielles. Chaque damier a été scanné à quatre gains différents : 100, 70, 50 et 30 pour une intensité maximale du laser (100%). Ces gains correspondent au pourcentage de lumière, émise par le fluorochrome, effectivement repris par le photodétecteur. Les quatre gains différents permettent d'obtenir des images sur lesquelles chaque groupe de trois spots se trouve au moins une fois non saturé. Seules les valeurs de quantification correspondant à des spots non saturés seront prises en considération et aucune conclusion ne peut être tirée si les spots restent saturés pour les quatre gains. Les différentes images obtenues après scanning sont reprises dans les figures III.9 pour l'expérience 1 et III.10 pour l'expérience 2 après 6 heures (Figure III.10.A), 12 heures (Figure III.10.B) et 24 heures (Figure III.10.C) de stimulation ou non avec le LPS.

Nous pouvons faire quelques commentaires sur la qualité des damiers après hybridation. Dans la figure III.9, nous constatons :

- **pour le CTL 24H** : Une tache de bruit de fond bien marquée est observable dans la partie médiane inférieure du damier. Une autre tache, plus discrète, est présente dans la partie supérieure gauche du damier.

- **pour le test LPS 24H** : Bruit de fond faible.

De même, nous pouvons faire une série d'observations pour les figures III.10 A, B et C :

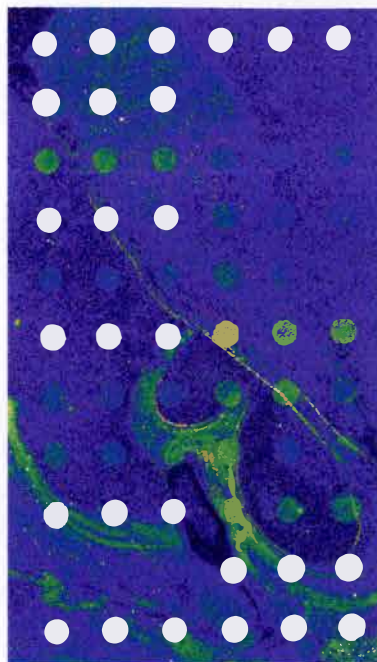
- **pour le CTL 6H** : Bruit de fond négligeable. Nous pouvons noter la présence de quelques petites taches discrètes

- **pour le test LPS 6H** : Présence de bruit de fond et de taches dans la partie supérieure du damier. Nous pouvons noter leur atténuation dès le gain 70.

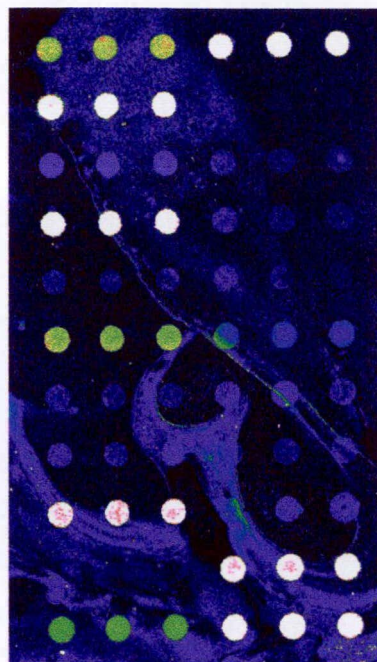
Figure III.9 : Hybridation (1 nuit) d'ADN complémentaires bioinylés (2 μ g) issus de la transcription inverse d'ARN messagers extraits de cellules contrôles et de cellules stimulées au LPS (10 μ g/ml) pendant 24 H. Scannings aux gains 100, 70, 50 et 30.

CTL 24H

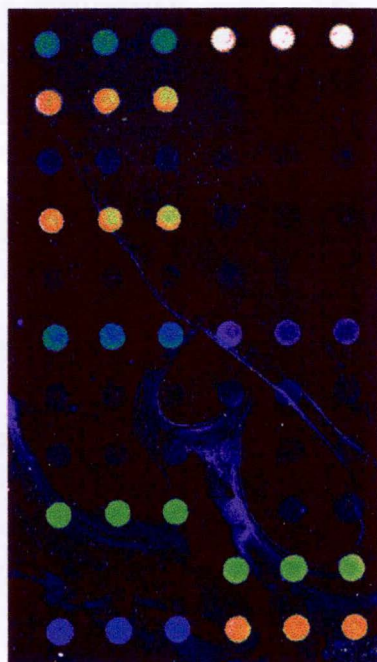
CTL Fix. 10 nM
B-ACTINE
CCR2 A
RBCL
IL1- β
GAPDH
TF
PPAR α
CAB
CD36
CTL Fix. 10 nM



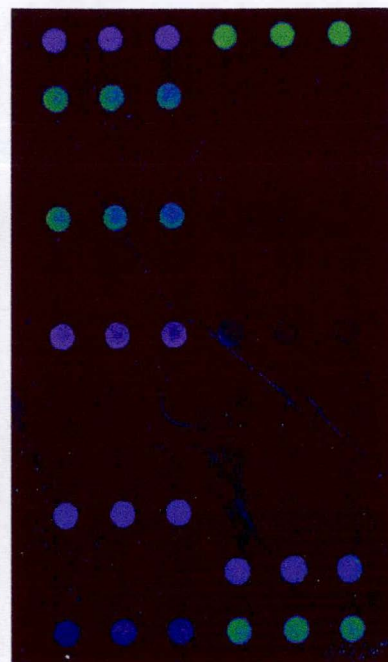
G100



G70



G50

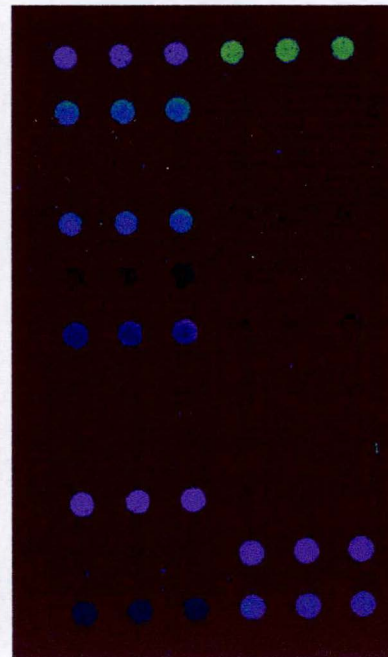
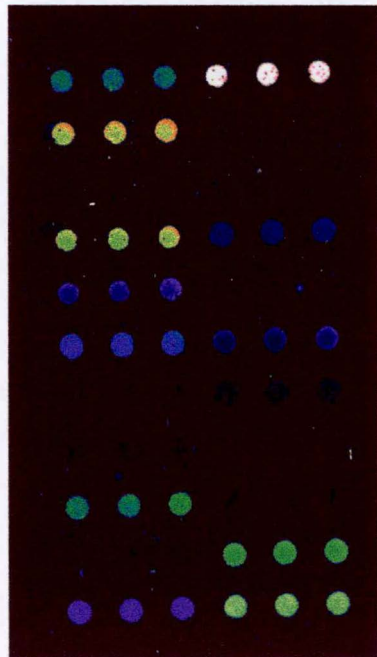
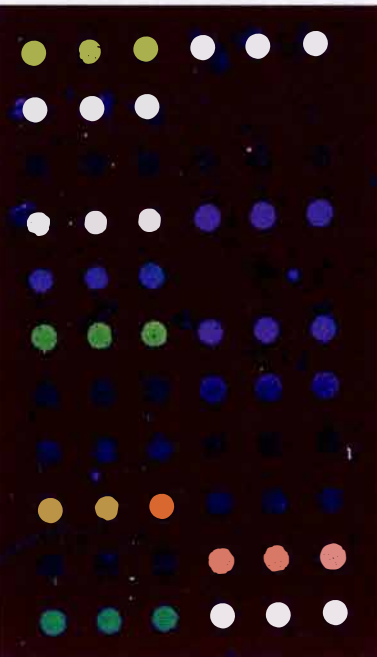
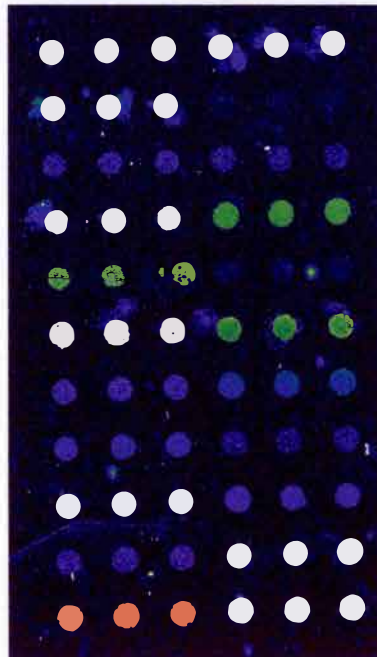


G30

CTL Hyb. + (CMV)
CTL Hyb. - (HIV)
L-SELECTINE
TNF α
IL6
RCA
THBD
PPAR γ
MSR1
B-ACTINE
CTL Hyb. + CMV

LPS 24H

CTL Fix. 10 nM
B-ACTINE
CCR2 A
RBCL
IL1- β
GAPDH
TF
PPAR α
CAB
CD36
CTL Fix. 10 nM



CTL Hyb. + (CMV)
CTL Hyb. - (HIV)
L-SELECTINE
TNF α
IL6
RCA
THBD
PPAR γ
MSR1
B-ACTINE
CTL Hyb. + CMV

Figure III.10A : Hybridation (1 nuit) d'ADN complémentaires biotinylés (2µg) issus de la transcription inverse d'ARN messagers extraits de cellules contrôles et de cellules stimulées au LPS (10 µg/ml) pendant 6 heures. Scannings aux gains 100, 70, 50 et 30..

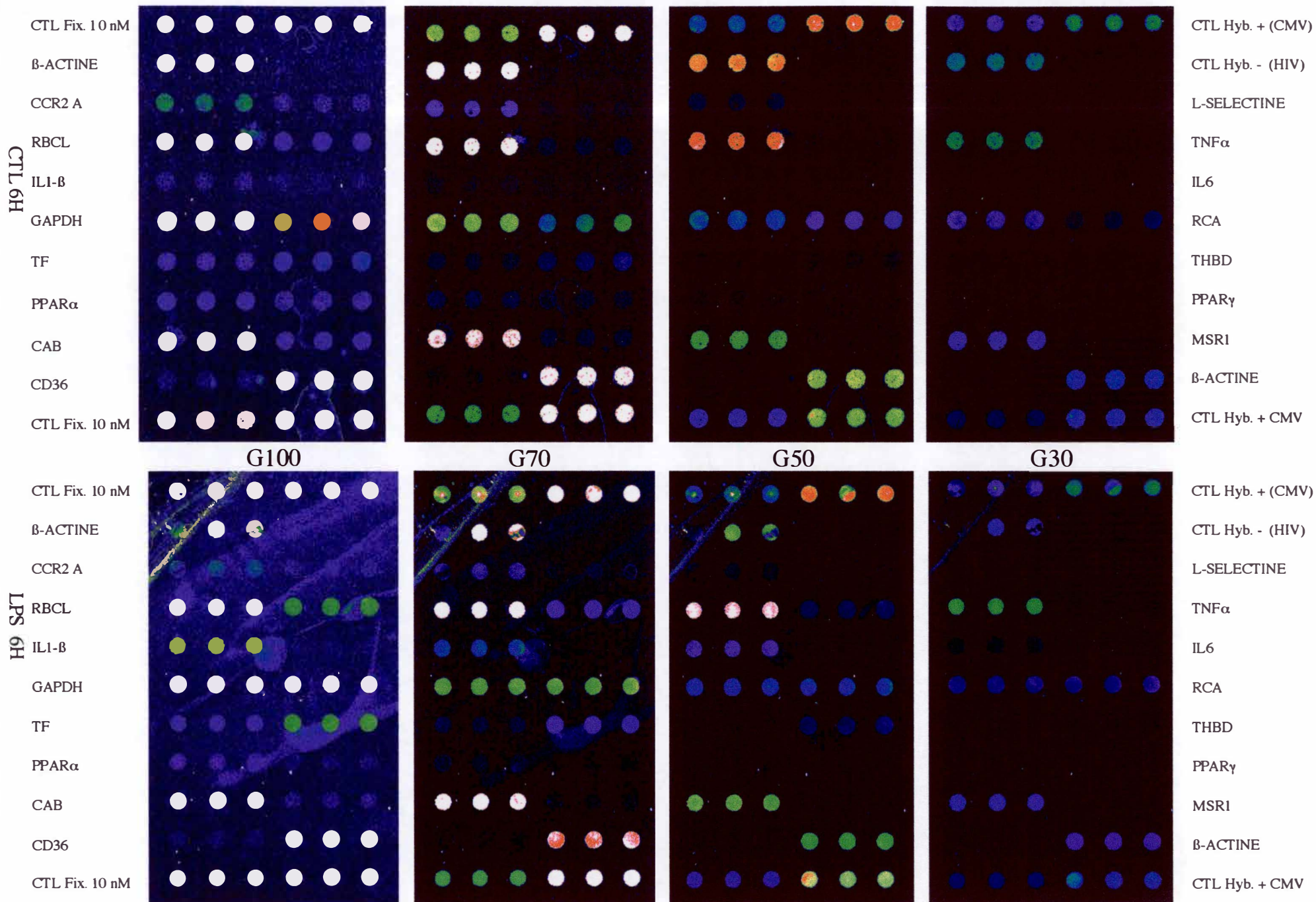


Figure III.10B : Hybridation (1 nuit) d'ADN complémentaires biotinylés (2µg) issus de la transcription inverse d'ARN messagers extraits de cellules contrôles et de cellules stimulées au LPS (10 µg/ml) pendant 12 heures. Scannings aux gains 100, 70, 50 et 30.

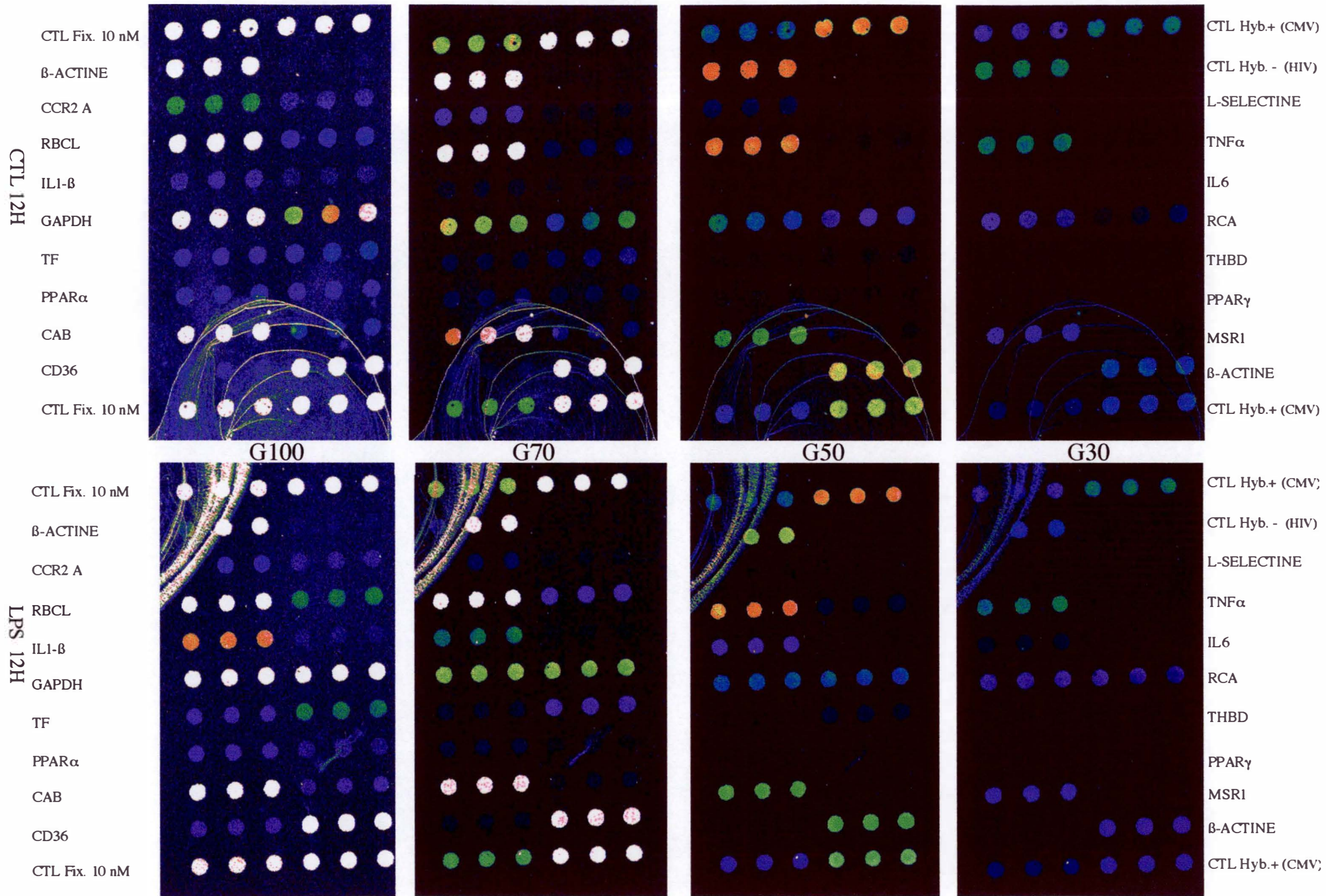
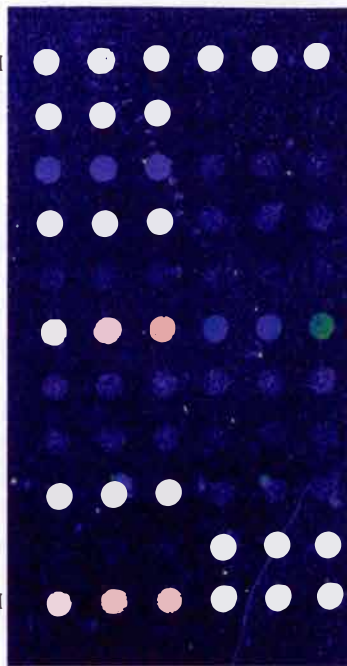


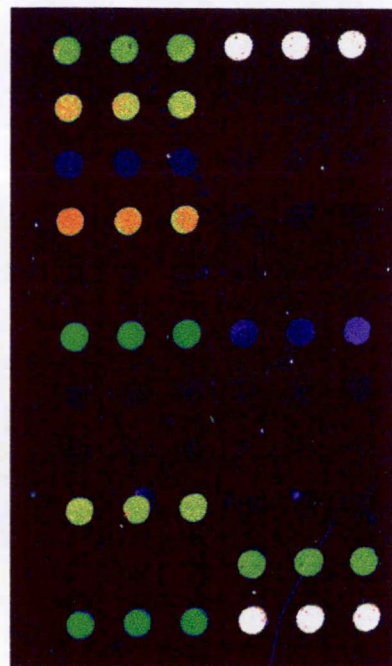
Figure III.10C : Hybridation (1 nuit) d'ADN complémentaires biotinylés (2µg) issus de la transcription inverse d'ARN messagers extraits de cellules contrôles et de cellules stimulées au LPS (10 µg/ml) pendant 24 heures. Scanning s aux gains 100, 70, 50 et 30.

CTL 24H

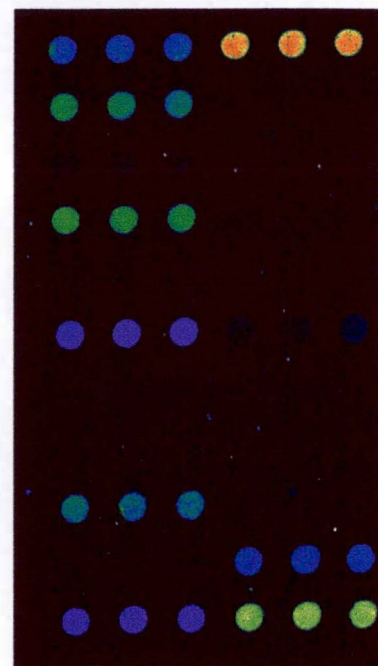
CTL Fix. 10 nM
B-ACTINE
CCR2 A
RBCL
IL1-B
GAPDH
TF
PPARα
CAB
CD36
CTL Fix. 10 nM



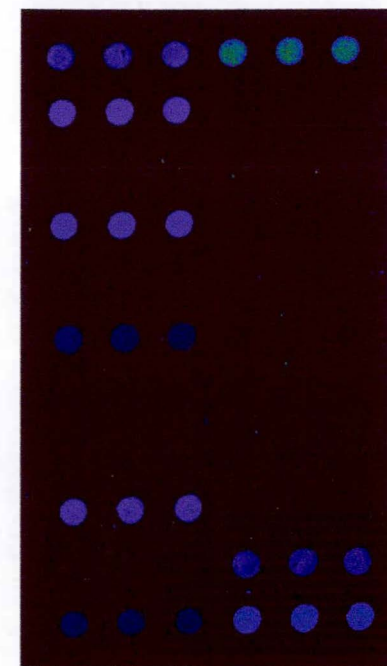
G100



G70



G50

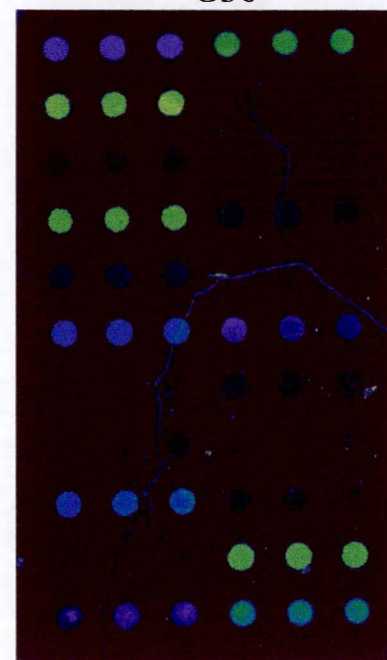
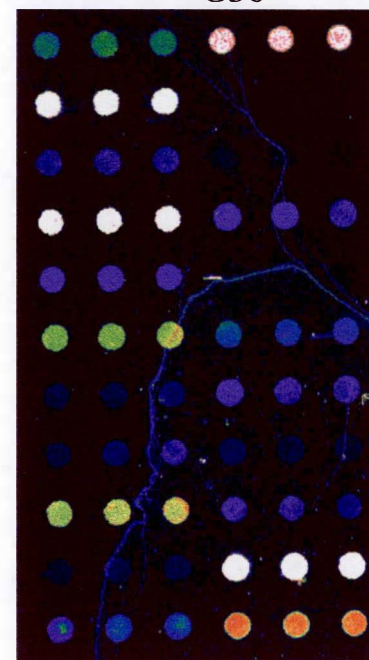
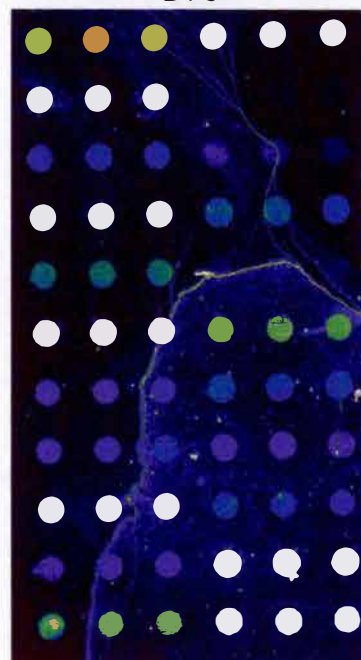
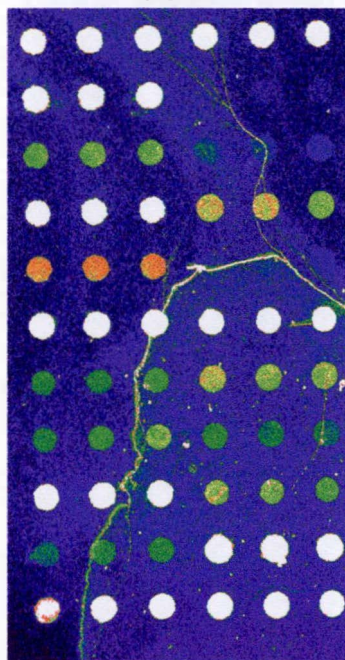


G30

CTL Hyb. + (CMV)
CTL Hyb. - (HIV)
L-SELECTINE
TNFα
IL6
RCA
THBD
PPARγ
MSR1
B-ACTINE
CTL Hyb. + (CMV)

LPS 24H

CTL Fix. 10 nM
B-ACTINE
CCR2 A
RBCL
IL1-B
GAPDH
TF
PPARα
CAB
CD36
CTL Fix. 10 nM



CTL Hyb. + (CMV)
CTL Hyb. - (HIV)
L-SELECTINE
TNFα
IL6
RCA
THBD
PPARγ
MSR1
B-ACTINE
CTL Hyb. + (CMV)

- **pour le CTL 12H** : Présence de taches caractéristiques laissées par une bulle lors du thermomixage dans le bas du damier. Nous pouvons remarquer que malgré la présence d'une bulle, grâce au thermomixage, l'hybridation a pu se faire.
- **pour le test LPS 12H** : Présence de taches caractéristiques laissées par une bulle lors du thermomixage dans le coin supérieur gauche du damier. Le bruit de fond est globalement faible.
- **pour le CTL 24H** : Bruit de fond faible. Pas de taches.
- **pour le test LPS 24H** : Bruit de fond non négligeable au gain 100, mais il s'estompe rapidement pour les gains suivants. Nous pouvons observer une tache de bruit de fond laissée par une bulle lors du thermomixage dans la moitié inférieure du damier.

Pour l'ensemble des damiers, les contrôles d'hybridation négatifs sont bien éteints; les contrôles d'hybridation positifs et de fixation sont allumés comme attendu.

6. Quantification

Les étapes de quantification ainsi que le mode de traitement des données sont repris dans les Matériel et Méthodes au Point 18.

7. Effets du LPS sur l'expression des gènes dans les cellules THP-1. Analyse avec le microdamier

Après traitement des données de quantification, les facteurs de variation d'expression de gène sont portées en graphique (voir figures III.11 à III.15).

7.1. Effet du LPS sur l'expression de gènes dans des cellules THP-1 stimulées pendant 24 heures par rapport à des THP-1 contrôles (Expérience 1)

Nous pouvons observer, tout d'abord, la très faible variation d'expression des « housekeeping genes » (Actine bêta et GAPDH). Comme attendu, leur expression varie très peu entre la situation contrôle et la situation test. Leur présence sur le

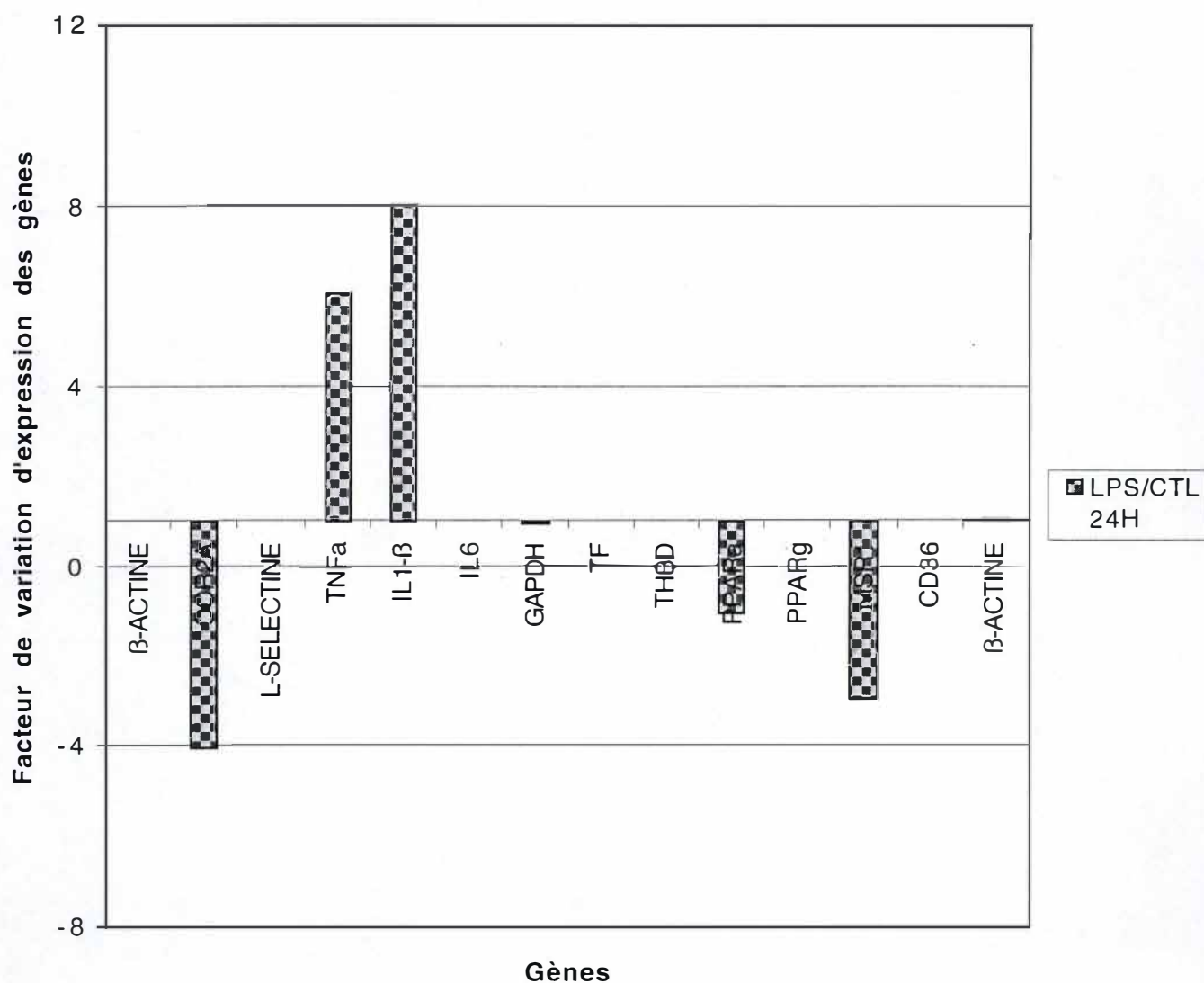


Figure III.11 : Effet du LPS sur l'expression des gènes cibles pour le microdamier pour des cellules THP-1 stimulées pendant 24 heures par rapport à des THP-1 contrôles (Expérience 1).

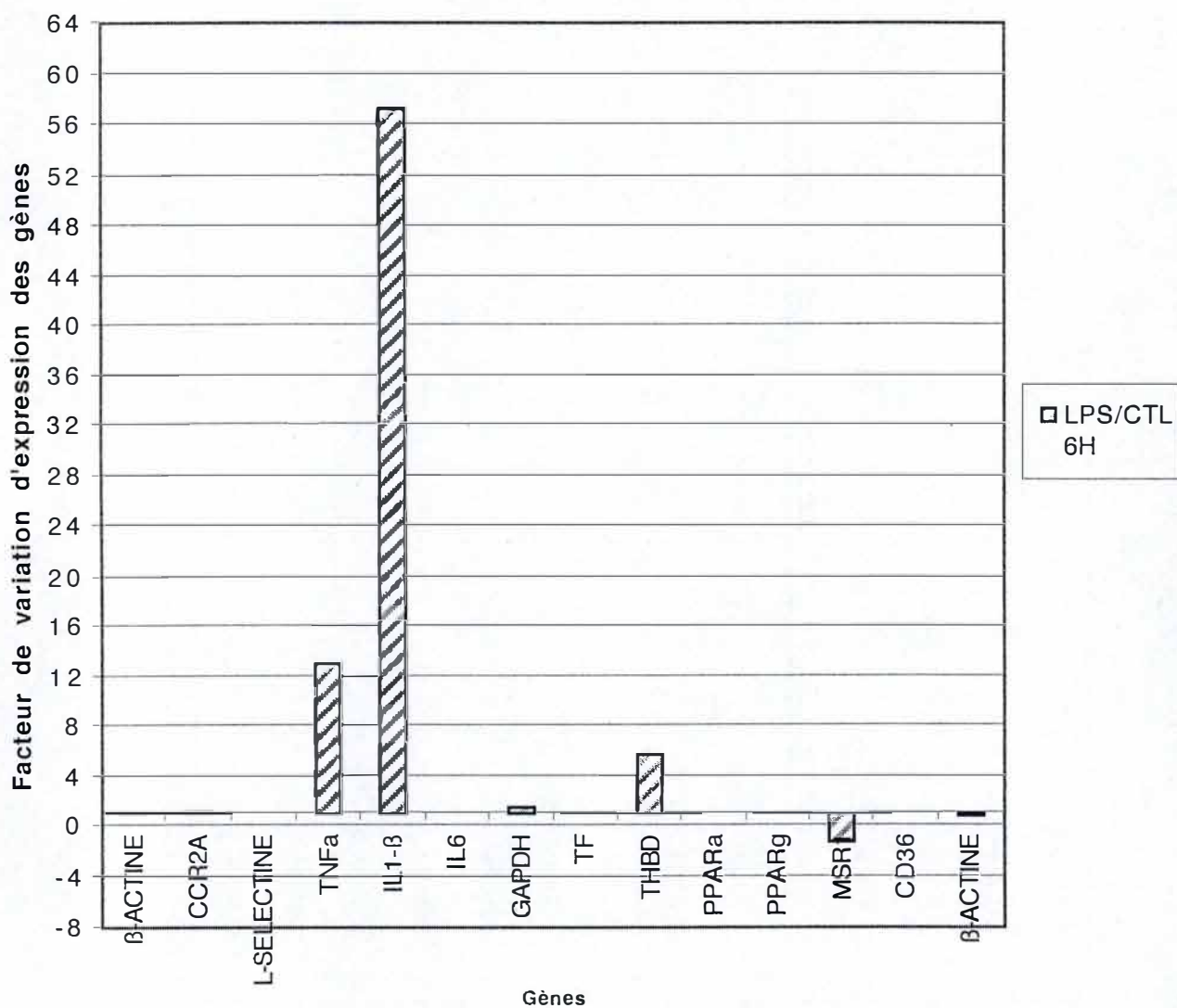


Figure III.12 : Effet du LPS sur l'expression des gènes cibles pour le microdamier pour des cellules THP-1 stimulées pendant 6 heures par rapport à des THP-1 contrôle (Expérience 2).

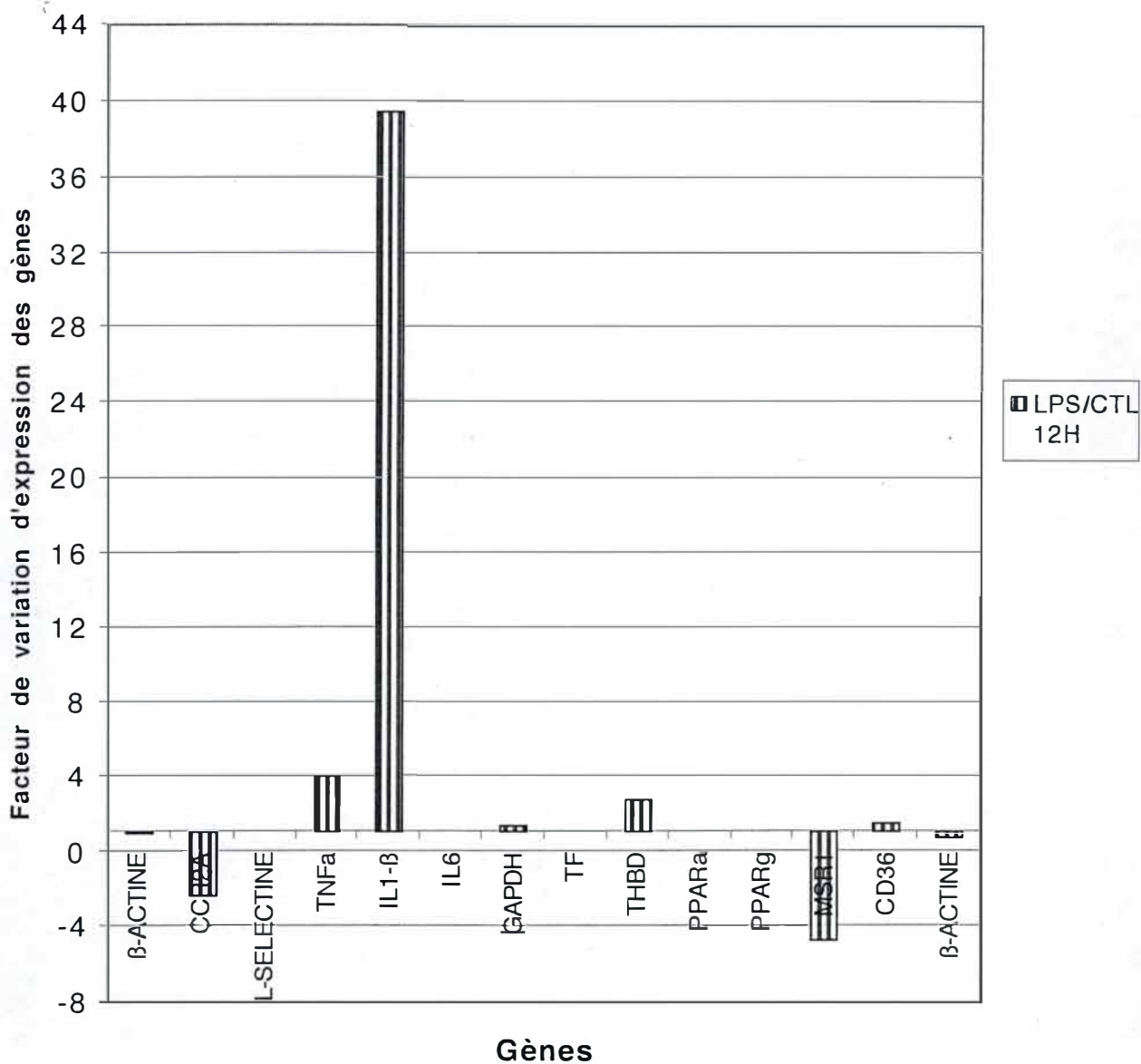


Figure III.13 : Effet du LPS sur l'expression des gènes cibles pour le microdamier pour des cellules THP-1 stimulées pendant 12 heures par rapport à des THP-1 contrôles (Expérience 2).

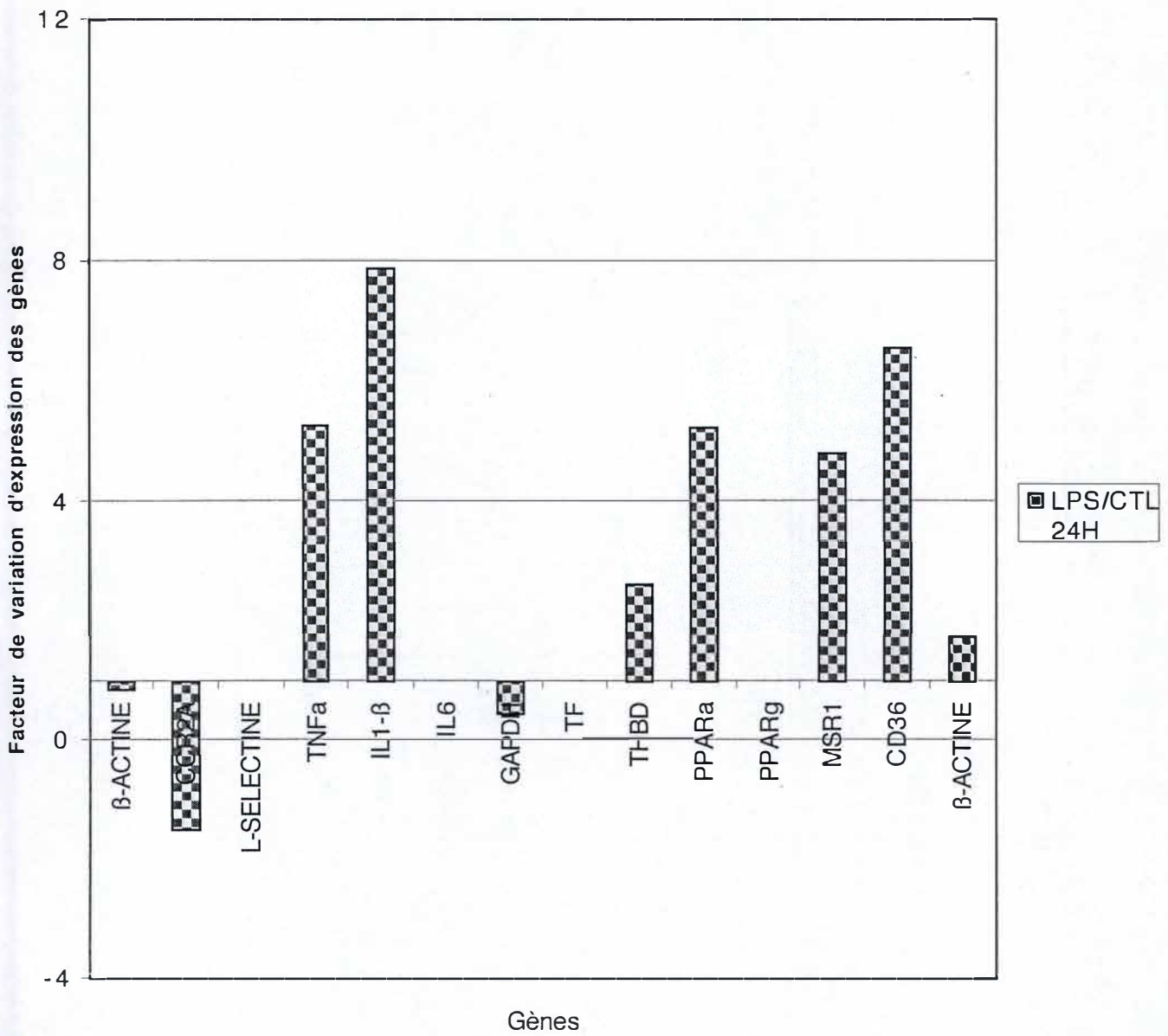


Figure III.14 : Effet du LPS sur l'expression des gènes cibles pour le microdamier pour des cellules THP-1 stimulées pendant 24 heures par rapport à des THP-1 contrôles (Expérience 2).

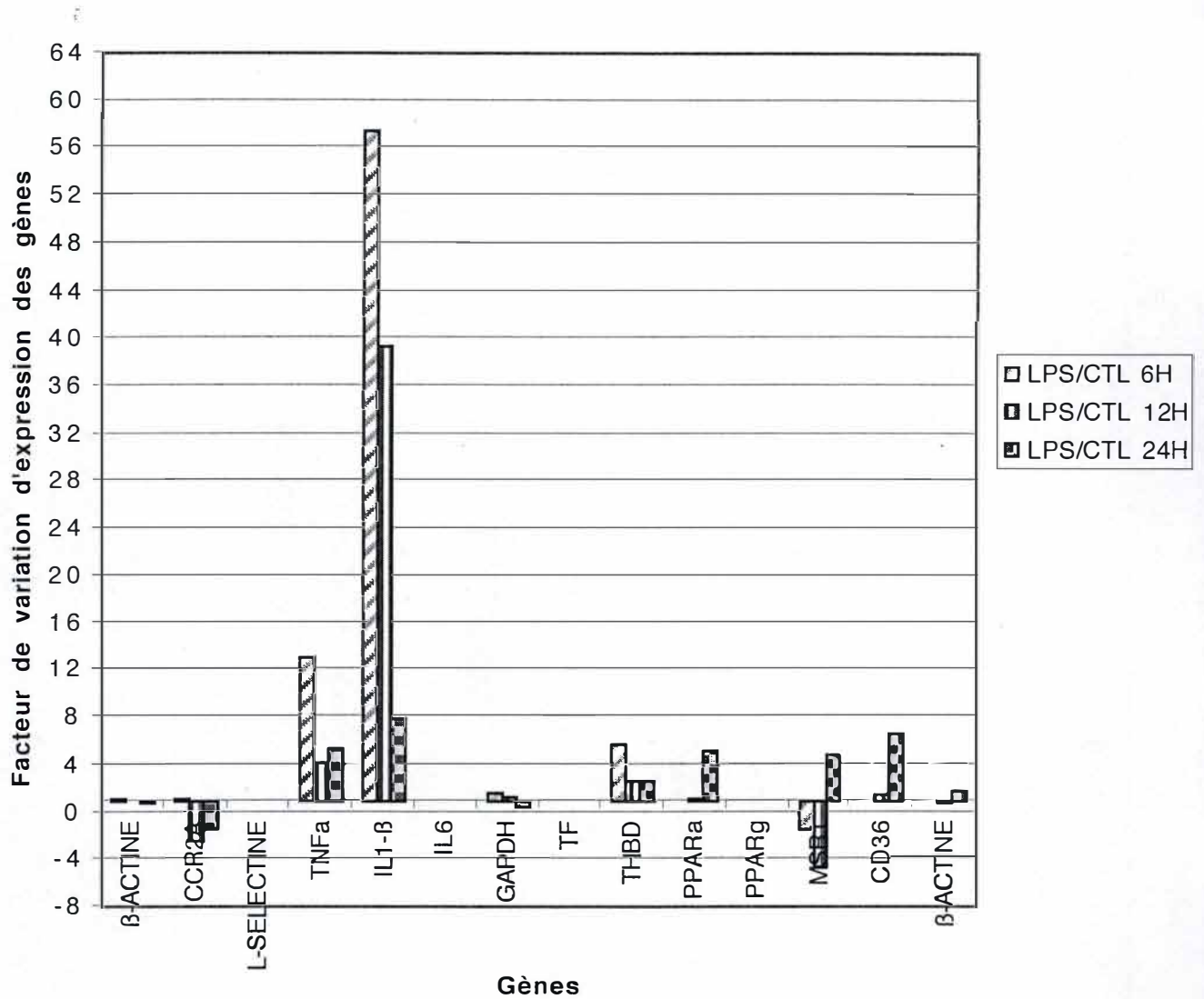


Figure III.15 : Effet du LPS sur l'expression des gènes cibles pour le microdamier, pour des cellules THP-1 stimulées pendant 6,12 et 24 heures par rapport aux THP-1 contrôles correspondantes (Expérience 2).

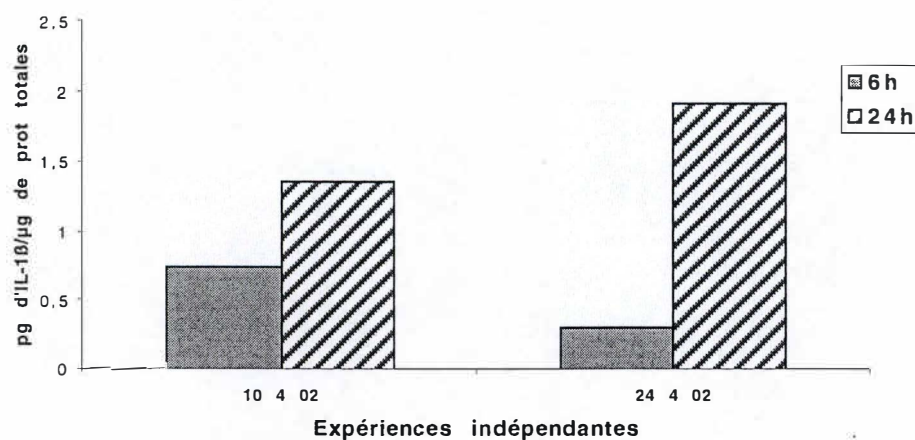


Figure III.16 : Tests ELISA permettant de doser la quantité d'IL-1 β produite par des cellules THP-1 stimulées 6h ou 24h avec du LPS (10 μ g/ml), et rapportée à la quantité de protéines totales déterminée par un dosage protéique « Folin ». Deux expériences indépendantes sont présentées, une réalisée le 10/04/2002, l'autre réalisée le 24/04/02.

graphique implique la coupure de l'axe des ordonnées par l'axe des abscisses à la valeur 1. D'autre part, nous pouvons observer une augmentation de la variation d'expression du gène TNF alpha de six fois ainsi que du gène de l'Interleukine-1 bêta de huit fois. Par contre, on peut observer une diminution de l'expression du gène CCR2A de quatre fois ainsi que du gène MSR1 de 3 fois. Pour les autres gènes repris sur le microdamier, la variation d'expression est comprise entre -1 et +1, ce qui n'est pas relevant. Afin de mettre en évidence une induction maximale pour ces deux gènes, nous avons décidé de réaliser une cinétique en stimulant les cellules THP-1 pendant des périodes de 6, 12 et 24 heures afin de mettre en évidence des variations plus précoces.

7.2. Effet du LPS sur l'expression d'expression de gènes dans des cellules THP-1 stimulées entre 6 et 24 heures (Expérience 2) par rapport à des THP-1 contrôles

Pour les temps **6 heures** (Figures III.12), comme pour le graphique précédent, les « housekeeping genes » présentent une faible variation d'expression, proche de 1. Nous pouvons aussi observer une augmentation très importante de l'expression du gène de l'Interleukine 1 bêta de 56 fois. Pour le TNF alpha la variation d'expression par rapport au contrôle est de 12 fois. On observe également une augmentation de six fois, de la variation d'expression du gène de la thrombomoduline. Par contre, on remarque une diminution faible de l'expression du gène MSR1. Pour les autres gènes repris sur le microdamier, la variation d'expression est comprise entre -1 et +1 pour ce temps de stimulation.

Pour le temps **12 heures** (Figure III.13), les résultats obtenus pour cette expérience montrent une variation non relevante de l'expression des « housekeeping genes », comme attendu. On observe toujours une augmentation de la variation d'expression du gène IL1-bêta de 40 fois. De même, on observe une augmentation de l'expression des gènes TNF alpha et THBD, respectivement de 4 et 2 fois. Pour les autres gènes repris sur le microdamier, les variations d'expression observées sont comprises entre -1 et +1. Pour le temps **24 heures** (Figure III.14), comme attendu, les « houseskeeping genes » présentent une variation d'expression très faible. Nous pouvons remarquer une augmentation de la variation d'expression des gènes TNF alpha et IL1-B

respectivement de 6 et 8 fois. Par contre, on observe également une augmentation de la variation d'expression des gènes THBD, PPAR alpha, PPAR gamma, MSR1 et CD36. Les variations d'expression observées pour les gènes PPAR alpha, MSR1 et CD36 ne correspondent pas à ce qui a été observé pour l'expérience 1 réalisée également après de 24 heures de stimulation au LPS.

Pour les autres gènes repris sur le microdamier (L-sélectine, IL6, TF, PPAR gamma et CCR2A), les variations d'expression qui leur sont associées sont comprises entre -1 et +1, et ne sont donc pas pertinentes d'un point de vue de l'analyse.

Pour avoir une vision plus claire de la cinétique obtenue, après stimulation des cellules THP-1 avec du LPS, nous avons rassemblé les données de l'expérience 2 (Figure III.11 à III.14) dans un même graphique (Figure III.15).

7.3. Discussion

Comme illustré à la figure III.15, nous pouvons observer pour la cinétique qui a été réalisée entre 6 et 24 heures, un profil en « escalier » pour certains gènes. Celui-ci est bien marqué pour le gène de l'**IL1 bêta**. On retrouve un profil similaire, mais de manière moins évidente, pour le gène TNF alpha et celui de la THBD. L'induction est donc la plus forte après 6 heures de stimulations et elle est très marquée, puisque l'expression augmente de 56 fois pour l'IL-1 bêta et de 12 fois pour le TNF-alpha. Dès lors, nous observons bien une corrélation entre l'expression de ces gènes et des conditions inflammatoires, liées à l'incubation avec le LPS.

Nous avons montré que les gènes IL-1 bêta et TNF alpha étaient surexprimés après stimulation au LPS. Suzuki *et al.* (2000) observaient la même chose chez des monocytes humains isolés stimulés au LPS. Ils observent également l'augmentation d'expression du gène de l'IL-6, ce que nous n'observons pas. Cela peut être dû soit à la technique utilisée, soit au type cellulaire. D'un point de vue quantitatif, les comparaisons sont difficiles, car les techniques utilisées sont différentes et leur sensibilité n'est pas identique. Au laboratoire, nous avons voulu comparer la variation d'expression du gène de l'IL1 bêta et la production des protéines correspondantes. Dans ce but, une cinétique via un test ELISA, a été réalisée par Sofia Dos Santos Mendes, en vue de doser l'IL-1 bêta dans le surnageant de cellules stimulées au LPS. Nous pouvons observer sur la figure III.16, une augmentation de la production d'IL1

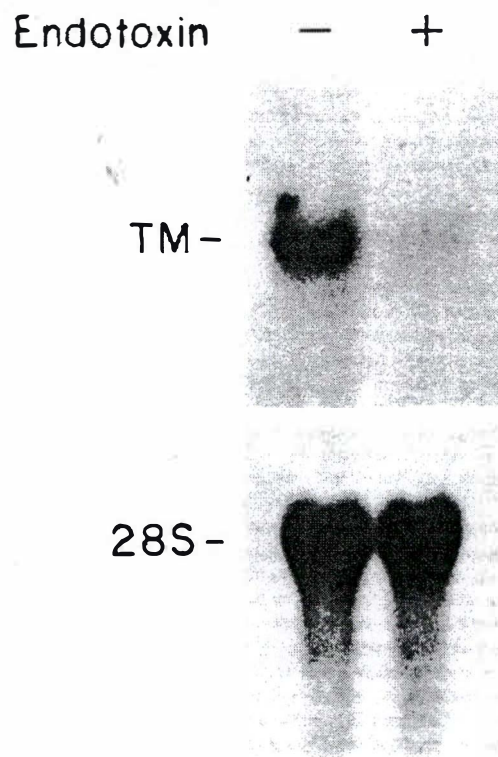


Figure III.17: Analyse par Northern Blot du taux d'ARN messager dans les cellules mononucléaires. Les cellules ont été stimulées avec des lipopolysaccharides (endotoxine) (1 $\mu\text{g/ml}$) pendant 4 heures. Le blot a été hybridé à une sonde pour la Thrombomoduline et réhybridé à une sonde pour l'ARN ribosomique 28S. (McCachren et *al.*, 1991)

bêta pour des stimulations de 6 et 24 heures, et ce pour deux expériences indépendantes. Bien que les cinétiques de production pour l'IL-1 bêta diffèrent quelque peu entre les deux expériences, la tendance reste la même : non stimulés, les monocytes ne produisent pas d'IL1 bêta (résultats non montrés). Stimulées avec du LPS, cette production augmente au cours du temps, jusqu'à 24 heures. Des temps plus longs n'ont pas été testés. Cette production de cytokines est décalée dans le temps par rapport au pic observé sur la figure III.15. Ce décalage correspondrait au temps nécessaire à la production des protéines mises en évidence par le test ELISA. Ceci confirme bien qu'en conditions inflammatoires, la production d'IL-1 bêta est en relation avec la synthèse d'ARN messenger correspondant. En ce qui concerne la thrombomoduline (THBD), la stimulation au LPS de cellules THP-1 induit une augmentation de l'expression de ce gène pour des temps courts (6 heures). Cette variation d'expression diminue au cours du temps (Figure III.15) et tend à un retour à la normale pour les temps de stimulation plus long (6 et 24 heures). Ces résultats sont en contradiction avec ceux de McCachren (1991). Cet auteur a montré par northern blot que le niveau d'ARN messenger de la thrombomoduline de cellules mononucléaires humaines, diminuait après quatre heures de stimulation avec du LPS (1 µg/ml) (Figure III.17). Les différences observées dans les variations d'expression du gène de la thrombomoduline entre ces deux expériences, pourraient être liées au type cellulaire utilisé. Dans le cadre de l'utilisation du microdamier, nous avons travaillé avec des cellules THP-1, qui sont des cellules humaines monocytaires d'origine **cancéreuse**. Or, dans l'expérience réalisée par McCachren, ce sont des monocytes humains **normaux** préalablement isolés du sang, qui ont été étudiés. Ceci pourrait expliquer les variations opposées d'expression du gène de la thrombomoduline en présence de LPS.

Paradoxalement, contrairement à ce que l'on peut retrouver dans la littérature, nous n'avons pas observé de variation significative de l'expression du gène du **Tissue Factor** (TF) pour les différents temps de stimulation réalisés. Il a été montré que la stimulation de monocytes avec du LPS (10 µg/ml) entraînait une augmentation de l'expression du gène du Facteur Tissulaire (Figure III.18) (Javorschi *et al.*, 2000). Cependant, ces stimulations ne dépassaient pas deux heures. Or, dans le cadre de notre expérience, les monocytes ont été stimulés au minimum six heures. On ne peut donc exclure que la variation d'expression du gène du Tissue Factor ne soit détectable que

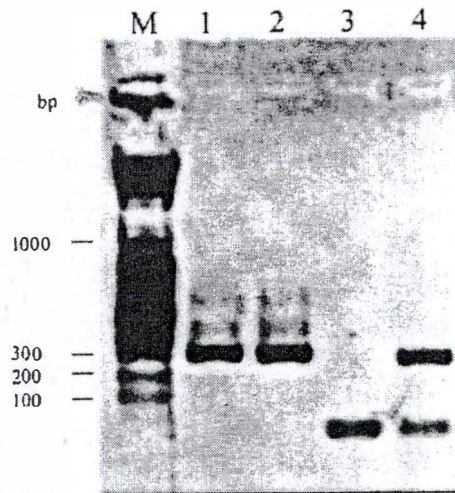


Figure III.18: Gel d'agarose (1,5%) sur lequel ont été déposés des fragments d'ADN complémentaire d'un standard endogène (MHC) et de la cible (TF) avec ou sans stimulation au LPS. M, marqueur de poids moléculaire; 1, fragments MHC de 307-310 pb sans stimulation au LPS; 2, fragments MHC de 307-310 pb avec stimulation au LPS; 3, fragments TF de 298 pb sans stimulation au LPS (non visible); 4, fragments TF de 298 pb avec stimulation au LPS (Javorschi et *al.* 2000).

pour des temps très courts de stimulation au LPS et que celle-ci étant transitoire, nous ne la détectons plus à 6 heures de stimulation avec du LPS. Ce point devra bien évidemment faire l'objet d'une vérification expérimentale.

En ce qui concerne CCR2A, nous observons dans les expériences 1 (Figure III.11) et 2 (Figure III.15), plutôt une tendance à la diminution de son expression ; au moins après 24 heures de stimulation avec le LPS. Cette diminution pourrait être corrélée à la production de TNF alpha. En effet, des études (Weber *et al.*, 1999) ont mis en évidence une diminution de l'expression protéique de CCR2 chez des cellules THP-1 par stimulation au TNF alpha. Cependant, l'ensemble des études réalisées se base sur l'isoforme B du récepteur CCR2. Or, avec le microdamier que nous avons réalisé, nous ne pouvons détecter que des transcrits d'ARN messager correspondant à l'isoforme A. Bien que l'isforme étudiée soit différente, il est tout de même intéressant de considérer cette diminution. Evidemment, celle-ci devra être confirmée par l'ajout sur le microdamier de trappeurs permettant l'analyse de la variation d'expression de l'isoforme B en conditions inflammatoires. Etant donné que nous n'avons pas trouvé de clones adéquats pour cette isoforme, il faudra envisager de cloner un fragment du gène CCR2 B par RT-PCR en partant d'ARN messager obtenu à partir de THP-1.

Enfin, nous pouvons observer des différences entre les expériences 1 et 2 pour le temps de stimulation de 24 heures au LPS. Dans l'expérience 2, on observe clairement pour les temps longs, une induction des gènes PPAR alpha, MSR1 et CD36, contrairement à l'expérience 1. De manière étonnante, PPAR alpha, MSR1 et CD36, sont induits quand le monocyte se différencie en macrophage. On peut donc se demander si dans l'expérience 2, les conditions de culture n'ont pas favorisé un début de différenciation des monocytes en macrophages. Il faut dire que les cellules étaient plus petites, « vieillissantes » et peu abondantes, même après 3 jours de culture en boîte T-75, ce qui est plutôt inhabituel. Nous avons également constaté qu'au bout des 24 heures de stimulation avec le LPS, elles avaient plus que d'habitude, tendance à adhérer au substrat de culture, ce qui corrobore également notre hypothèse. Nous n'avons pas encore testé le microdamier sur des cellules THP-1 « différenciées » en macrophage avec le PMA (Phorbol myristate acétate). Mais les premières données

obtenues, suggèrent que le microdamier permettrait également de vérifier la « qualité » des cellules THP-1.

IV. Conclusions et Perspectives

Conclusions et perspectives

L'athérosclérose est une pathologie multi-factorielle, impliquant plusieurs acteurs cellulaires et dont l'évolution s'étend sur toute une vie. Les processus athérosclérotiques peuvent déjà s'initier dès l'enfance, alors que les premières manifestations cliniques n'apparaissent que vers la quarantaine entraînant souvent des invalidités pouvant être sévères ou menant simplement à la mort. Dès lors, il paraît important de se focaliser sur les processus initiaux menant à l'apparition de l'athérosclérose, afin de mieux les comprendre, de pouvoir les mettre en évidence et de les anihiler avant l'apparition de lésions athérosclérotiques souvent mises en évidence trop tardivement.

Afin d'étudier ces processus, caractérisés par un contexte inflammatoire, nous nous sommes intéressés au **monocyte humain**. En effet, celui-ci est un acteur central dans la pathologie de par son entrée dans l'intima et sa différenciation en macrophage pouvant former en condition pro-athérogènes des cellules spumeuses impliquées dans la formation de l'athérome. Dans le cadre de l'étude du monocyte dans les étapes précoces de l'athérosclérose, souvent liées à un contexte inflammatoire, nous avons fait le choix du microdamier à ADN comme moyen d'analyse, microdamier dont la technologie et le savoir faire sont bien maîtrisés au laboratoire. Celui-ci permet de mettre en évidence des variations d'expression de gènes de manière **très sensible**, d'une situation test par rapport à une situation contrôle. Dans notre cas la situation test, est une **exposition au LPS**, agent pro-inflammatoire bien connu.

Les études réalisées sur les profils d'expression de gènes chez les monocytes sont peu nombreuses et parmi elles, une grande majorité est consacrée à l'étude du transcriptome des cellules THP-1 différenciées en macrophages. Ces derniers, par leur localisation tissulaire sont difficiles d'accès, ce qui restreint leur étude à des travaux *in vitro*. Notre travail trouve son originalité dans le fait que les monocytes, à la différence des macrophages, sont circulants et sont donc accessibles pour des tests *in vivo*. L'outil développé lors de ce travail pourra être envisagé lors d'application *in vivo*.

Gènes	Abréviations	Fonctions principales
Actine bêta	ACTB	Housekeeping gene
Antigène CD36 (Récepteur au collagène type I, Récepteur à la thrombospondine)	CD36	Adhésion cellulaire, Endocytose de macromolécules dont LDL oxydées
Chémokine récepteur 2 (C-C motif) isoforme A	CCR2A	Chémotactisme
Facteur de coagulation III (Thromboplastine, Facteur Tissulaire)	TF	« Coagulation »
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPD	Housekeeping gene
Intégrine bêta 2	CD18	Rolling et transmigration
Interleukine 1 bêta	IL1B	Inflammation
Interleukine 6	IL6	Inflammation
Interleukine 8	IL8	Inflammation
L-Sélectine	LSEL	Rolling et transmigration
Macrophage Scavenger receptor 1	MSR1	Endocytose de macromolécules dont LDL oxydées
<u>Peroxisome proliferative activated receptor, alpha</u>	PPARA	Facteur de transcription
Peroxisome proliferative activated receptor, gamma	PPARG	Facteur de transcription
Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	COX2	Inflammation
Thrombomoduline	THBD	« Coagulation »
Tumor Necrosis Factor alpha	TNF α	Inflammation

Tableau IV.1 : Liste des gènes définie pour la réalisation du micro-damier (classement par ordre alphabétique des gènes)

Pour l'élaboration de ce microdamier prototype, nous avons fait initialement le choix de 16 gènes relevant dans le cadre de l'étude menée (Tableau IV.1). Les séquences d'ARN messager correspondant à ces gènes ont été recherchées dans les banques de séquences mises à disposition par le NCBI. Nous avons ensuite recherché les clones correspondant à ces séquences dans la banque RZPD (Ressourcenzentrum/Primäre DatenBank), selon des critères bien définis et liés à la technologie développée au laboratoire. Tous les clones ont pu être trouvés, à l'exception des clones correspondant à la prostaglandine-endoperoxyde synthétase 2 ou cyclooxygénase 2 et de l'interleukine 8 (IL8), lesquels ne répondaient pas à nos critères de sélection. A partir de l'ensemble des clones disponibles, nous avons pu produire par PCR des ADN de capture qui ont été purifiés, concentrés et quantifiés avant d'être « spottés » sur des lames fonctionnalisées. Malheureusement, une PCR a posé problème : les ADN de capture pour l'intégrine bêta 2 n'ont pas pu être spottés, car des bandes parasites, apparaissant lors de la PCR, ont empêché leur utilisation dans la suite du processus d'élaboration du microdamier. Ces bandes, dont la nature n'a pas pu être déterminée, auraient pu entraîner des problèmes de spécificité. La spécificité a été vérifiée pour chaque type de trappeurs par hybridation de cibles biotinylées également produites par PCR. Cette spécificité a pu être montrée avec succès pour l'ensemble des spots du microdamier.

Le damier prototype finalisé, nous l'avons testé pour suivre l'expression de cellules THP-1 en culture. Les cellules monocytaires THP-1 ont été stimulées (ou non) avec du LPS pour des temps de 6, 12 et 24 heures. L'ARN messager de ces cellules a été extrait, quantifié et retro-transcrit en ADN complémentaire avant d'être hybridé sur les microdamiers préalablement réalisés. Après révélation et quantification, les résultats ont été normalisés et analysés.

Nous avons pu mettre en évidence, une augmentation significative de la variation d'expression du gène de l'interleukine 1 bêta, du Tumor Necrosis Factor alpha et de la thrombomoduline suite à la stimulation au LPS. Pour l'IL1 bêta et le TNF alpha, les augmentations d'expression sont considérables puisqu'elles sont supérieures respectivement à 56 et 12 fois (au temps 6 heures de stimulation avec le LPS). Ces augmentations sont les plus importantes pour six heures de stimulation au LPS et diminuent progressivement pour des temps de stimulation plus longs, de 12 et 24 heures. Un profil en « escalier » est

clairement observable pour l'interleukine-1 bêta, un peu moins évident pour la thrombomoduline et le TNF alpha. Toujours pour l'interleukine-1 bêta, nous avons pu mettre en évidence une corrélation entre la production d'ARN messager et la production de protéines correspondantes, avec un décalage de 12 heures entre le pic pour l'ARN messager (à 6 heures) et le pic pour les protéines correspondantes (à 24 heures). Par contre, nous n'avons pas observé de variation de l'expression du gène du Tissue Factor, alors que l'expression de celui-ci est connue pour être modifiée en conditions inflammatoires. Ces différences pourraient être dues au fait que les cellules THP-1 sont des cellules d'origine cancéreuse. Il est clair que le microdamier devra être utilisé pour suivre l'expression des monocytes fraîchement isolés, exposés *in vitro* à du LPS. Il n'en demeure pas moins vrai que le microdamier prototype que nous avons construit et testé, s'avère extrêmement sensible pour détecter des processus d'activation des monocytes.

Enfin, nous avons observé une diminution significative de l'expression du gène encodant les récepteurs CCR2 (isoforme A) après 24 heures de stimulation. Cette diminution pourrait être corrélée avec la production de Tumor Necrosis Factor (pic à 6 heures), qui agirait de manière autocrine, mais rien n'est moins sûr, car l'ensemble des études menées sur CCR2 se basent sur l'isoforme B, qui n'a pas pu être reprise sur le damier par le simple fait qu'aucun clone adéquat n'est disponible. Pour les autres gènes, aucune variation relevante n'a pu être observée. Quant aux gènes MSR1, CD36 et PPAR alpha, nous avons également constaté qu'ils étaient induits dans l'expérience 2, après 24 heures. Nous pensons que cette induction est liée à un début de différenciation des monocytes en macrophages, probablement parce que les conditions de culture des THP-1 n'étaient plus idéales. Il faudra donc tester le microdamier sur des monocytes THP-1 différenciés en macrophages, à l'aide du PMA, pendant 24 heures. Ce traitement induit *in vitro* la différenciation des monocytes en macrophage qui peuvent d'ailleurs en présence d'ox-LDL se gorger de lipides pour devenir des cellules spumeuses.

Donc, en conditions pro-inflammatoires, le monocyte présenterait une variation de l'expression du gène de l'IL1 bêta, du TNF alpha et de la THBD. Bien entendu, ces résultats ne permettent en aucune façon une caractérisation suffisante de la variation d'expression de gènes chez les monocytes en conditions inflammatoires. En effet, le microdamier réalisé n'est qu'un prototype et doit être beaucoup plus largement étendu afin de définir de manière

complète les patterns d'expression en conditions inflammatoires chez les monocytes. Ceux-ci pourront alors être comparés aux patterns d'expression de gènes des monocytes en conditions pro-athérogènes, afin de définir les similitudes et les différences entre une inflammation *stricto sensu* et les étapes initiales de l'athérosclérose caractérisées par un contexte inflammatoire, combiné à un excès de cholestérol.

Dans un avenir proche, la séquence de l'isoforme B du gène du récepteur CCR2 sera clonée et des ADN de capture correspondants seront ajoutés sur le microdamier. De la sorte, une caractérisation plus précise de l'expression de ce gène pourra être établie. De même, il reste toujours à produire les trappeurs correspondants à l'interleukines 8 et la prostaglandine –endoperoxyde synthétase2 (COX2), qui jouent toutes deux un rôle important dans la mise en place et l'entretien d'un contexte inflammatoire.

L'ensemble des gènes relevant pour la poursuite de la construction d'un microdamier à ADN plus élaboré, seront définis grâce à l'utilisation de membranes à haute densité, recouvrant environ 90 % du genome humain. Celles-ci sont réalisées par la firme RZPD (Ressourcenzentrum/Primäre DatenBank), chez qui des échantillons d'ARN messager de cellules monocytaires THP-1, préalablement stimulées ou non avec différentes molécules d'intérêt, seront envoyés pour être hybridés sur une membrane à haute densité. Cette analyse pointera les gènes pour lesquels une variation significative d'expression aura été observée. A partir de là, le microdamier pourra être plus largement étendu, en y incorporant des trappeurs pour des gènes que les approches *a priori*, n'auraient probablement pas sélectionnés. Outre son utilisation dans le cadre de la définition de patterns d'expression de gènes de monocytes exposés à des conditions pro-inflammatoires et pro-athérogènes, il pourra être utilisé pour l'étude de la différenciation du monocyte en macrophage.

Dans un avenir plus lointain, le microdamier pourra être utilisé, une fois que les patterns d'expression de gènes pour les monocytes auront été établis, comme moyen de diagnostic moléculaire pour déceler d'éventuelles anomalies au niveau des monocytes, par exemple chez des patients hypercholestérolémiques.

V. Bibliographie

Bibliographie

- Alon R., T. Feizi, C. T. Yuen, R. C. Fuhlbrigge and T. A. Springer, *Glycolipid ligands for selectins support leukocyte tethering and rolling under physiologic flow conditions*, J Immunol, 154, 5356-66., 1995.
- Alon R., H. Rossiter, X. Wang, T. A. Springer and T. S. Kupper, *Distinct cell surface ligands mediate T lymphocyte attachment and rolling on P and E selectin under physiological flow*, J Cell Biol, 127, 1485-95, 1994.
- Ashida N., H. Arai, M. Yamasaki and T. Kita, *Distinct signaling pathways for MCP-1-dependent integrin activation and chemotaxis*, J Biol Chem, 276, 16555-60, 2001.
- Beretz A., C. Klein-Soyer, G. Archipoff, C. Camilla, C. Brisson, J. M. Freyssinet and J.P. Cazenave, *Modulation by cytokines of leukocyte-endothelial cell interactions. Implications for thrombosis*, Biorheology, 27, 455-60, 1990.
- Blackstock W. P. and M. P. Weir, *Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins*, Trends Biotechnol, 17, 121-7, 1999.
- Brown E. J., *Adhesive interactions in the immune system*, trends CELL BIOLOGY, 7, 289-295, 1997.
- Brown E. J. and F. P. Lindberg, *Leucocyte adhesion molecules in host defence against infection*, Ann Med, 28, 201-8, 1996.
- Brown M. S. and J. L. Goldstein, *How LDL receptors influence cholesterol and atherosclerosis*, Sci Am, 251, 58-66, 1984.
- Burkitt H. G., B. Young and J. W. Heath, *Histologie fonctionnelle Wheater*, 1995.

- **Bustin S. A.**, *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays*, J Mol Endocrinol, 25, 169-93, 2000.

- **Charo I. F.**, *CCR2: from cloning to the creation of knockout mice*, Chem Immunol, 72, 30-41, 1999.

- **Charo I. F.**, S. J. Myers, A. Herman, C. Franci, A. J. Connolly and S. R. Coughlin, *Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails*, Proc Natl Acad Sci USA, 91, 2752-6, 1994.

- **Collins T.**, *Elements of Vascular Pathobiology*, in "Cellular and Molecular Pathogenesis", S. A. E. (Eds), Lippincott-Raven, 1996.

- **Cuthbert J. A.** and P. E. Lipsky, *Mitogenic stimulation alters the regulation of LDL receptor gene expression in human lymphocytes*, J Lipid Res, 31, 2067-78, 1990.

- **Duez H.**, J. C. Fruchart and B. Staels, *PPARS in inflammation, atherosclerosis and thrombosis*, J Cardiovasc Risk, 8, 187-94, 2001.

- **Dunon D.**, L. Piali and B. A. Imhof, *To stick or not to stick: the new leukocyte homing paradigm*, Curr Opin Cell Biol, 8, 714-23, 1996.

- **Fong L. G.**, T. A. Fong and A. D. Cooper, *Inhibition of lipopolysaccharide-induced interleukin-1 beta mRNA expression in mouse macrophages by oxidized low density lipoprotein*, J Lipid Res, 32, 1899-910, 1991.

- **Frenette P. S.**, T. N. Mayadas, H. Rayburn, R. O. Hynes and D. D. Wagner, *Susceptibility to infection and altered hematopoiesis in mice deficient in both P- and E-selectins*, Cell, 84, 563-74, 1996.

- **Gimbrone M. A., Jr.**, *Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis*, Am J Pathol, 155, 1-5, 1999.

- Glass C. K. and J. L. Witztum, *Atherosclerosis. the road ahead*, Cell, 104, 503-16, 2001.

- Grainger D. J., P. R. Kemp, A. C. Liu, R. M. Lawn and J. C. Metcalfe, *Activation of transforming growth factor-beta is inhibited in transgenic apolipoprotein(a) mice*, Nature, 370, 460-2, 1994.

- Green C. D., J. F. Simons, B. E. Taillon and D. A. Lewin, *Open systems: panoramic views of gene expression*, J Immunol Methods, 250, 67-79, 2001.

- Habenicht A. J., J. A. Glomset, W. C. King, C. Nist, C. D. Mitchell and R. Ross, *Early changes in phosphatidylinositol and arachidonic acid metabolism in quiescent swiss 3T3 cells stimulated to divide by platelet-derived growth factor*, J Biol Chem, 256, 12329-35, 1981.

- Habenicht A. J., J. A. Glomset and R. Ross, *Relation of cholesterol and mevalonic acid to the cell cycle in smooth muscle and swiss 3T3 cells stimulated to divide by platelet-derived growth factor*, J Biol Chem, 255, 5134-40, 1980.

- Hamilton T. A., G. P. Ma and G. M. Chisolm, *Oxidized low density lipoprotein suppresses the expression of tumor necrosis factor-alpha mRNA in stimulated murine peritoneal macrophages*, J Immunol, 144, 2343-50, 1990.

- Han K. H., R. K. Tangirala, S. R. Green and O. Quehenberger, *Chemokine receptor CCR2 expression and monocyte chemoattractant protein- 1-mediated chemotaxis in human monocytes. A regulatory role for plasma LDL*, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 18, 1983-91, 1998.

- Hashimoto S., T. Suzuki, H. Y. Dong, N. Yamazaki and K. Matsushima, *Serial analysis of gene expression in human monocytes and macrophages*, Blood, 94, 837-44, 1999.

Bibliographie

- **Javorschi S.**, S. Labrousche and G. Freyburger, *Tissue factor mRNA quantitation without prior monocyte isolation*, Biotechniques, 28, 1116, 1118, 1120, 1122 passim, 2000.

- **Karp G.**, *Biologie cellulaire et moléculaire, concepts et expériences*, in D. B. Université (Eds), De Boeck Université, 1998.

- **Koch A. E.**, P. J. Polverini, S. L. Kunkel, L. A. Harlow, L. A. DiPietro, V. M. Elner, S. G. Elner and R. M. Strieter, *Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis*, Science, 258, 1798-801, 1992.

- **Kozian D. H.** and B. J. Kirschbaum, *Comparative gene-expression analysis*, Trends Biotechnol, 17, 73-8, 1999.

- **Langseth L.**, *OXIDANTS, ANTIOXIDANTS, AND DISEASE PREVENTION*, 1995.

- **Leatham E. W.**, P. M. Bath, J. A. Tooze and A. J. Camm, *Increased monocyte tissue factor expression in coronary disease*, Br Heart J, 73, 10-3, 1995.

- **Libby P.**, *Changing concepts of atherogenesis*, J Intern Med, 247, 349-58., 2000.

- **Libby P.**, P. M. Ridker and A. Maseri, *Inflammation and atherosclerosis*, Circulation, 105, 1135-43, 2002.

- **Lusis A. J.**, *Atherosclerosis*, Nature, 407, 233-41, 2000.

- **Lusis A. J.**, A. Weinreb and T. A. Drake, *Textbook of Cardiovascular Medicine*, in (Eds), Lippincott-Raven, 2389-2413, 1998.

- **Malden L. T.**, A. Chait, E. W. Raines and R. Ross, *The influence of oxidatively modified low density lipoproteins on expression of platelet-derived growth factor by human monocyte-derived macrophages*, J Biol Chem, 266, 13901-7, 1991.

- **Migaki G. I.**, J. Kahn and T. K. Kishimoto, *Mutational analysis of the membrane-proximal cleavage site of L-selectin: relaxed sequence specificity surrounding the cleavage site*, J Exp Med, 182, 549-57, 1995.

- **Muller W. A.**, *The role of PECAM-1 (CD31) in leukocyte emigration: studies in vitro and in vivo*, J Leukoc Biol, 57, 523-8, 1995.

- **Nagy L.**, P. Tontonoz, J. G. Alvarez, H. Chen and R. M. Evans, *Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma*, Cell, 93, 229-40, 1998.

- **Neve B. P.**, J. C. Fruchart and B. Staels, *Role of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in atherosclerosis*, Biochem Pharmacol, 60, 1245-50, 2000.

- **Nofer J. R.**, B. Kehrel, M. Fobker, B. Levkau, G. Assmann and A. Eckardstein, *HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport*, Atherosclerosis, 161, 1-16, 2002.

- **O'Brien K. D.** and A. Chait, *The biology of the artery wall in atherogenesis*, Med Clin North Am, 78, 41-67, 1994.

- **Paulsson G.**, X. Zhou, E. Tornquist and G. K. Hansson, *Oligoclonal T cell expansions in atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice*, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 20, 10-17, 2000.

- **Pavalko F. M.**, D. M. Walker, L. Graham, M. Goheen, C. M. Doerschuk and G. S. Kansas, *The cytoplasmic domain of L-selectin interacts with cytoskeletal proteins via alpha-actinin: receptor positioning in microvilli does not require interaction with alpha-actinin*, J Cell Biol, 129, 1155-64, 1995.

- **Piali L.**, P. Hammel, C. Uhrek, F. Bachmann, R. H. Gisler, D. Dunon and B. A. Imhof, *CD31/PECAM-1 is a ligand for alpha v beta 3 integrin involved in adhesion of leukocytes to endothelium*, J Cell Biol, 130, 451-60, 1995.

- **Pomerantz K. B.**, A. C. Nicholson and D. P. Hajjar, *Signal transduction in atherosclerosis: second messengers and regulation of cellular cholesterol trafficking*, Adv Exp Med Biol, 369, 49-64, 1995.

- **Rawn D. J.**, *TRAITÉ DE Biochimie*, De Boeck Université, 1990.

- **Reape T. J.** and P. H. Groot, *Chemokines and atherosclerosis*, Atherosclerosis, 147, 213-25, 1999.

- **Ross R.**, *Atherosclerosis--an inflammatory disease*, N Engl J Med, 340, 115-26, 1999.

- **Ross R.** and J. A. Glomset, *The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts)*, N Engl J Med, 295, 369-77., 1976.

- **Shepherd J.**, *Lipoprotein metabolism. An overview*, Drugs, 47 Suppl 2, 1-10, 1994.

- **Shiffman D.**, T. Mikita, J. T. Tai, D. P. Wade, J. G. Porter, J. J. Seilhamer, R. Somogyi, S. Liang and R. M. Lawn, *Large scale gene expression analysis of cholesterol-loaded macrophages*, J Biol Chem, 275, 37324-32, 2000.

- **Staels B.**, W. Koenig, A. Habib, R. Merval, M. Lebreton, I. P. Torra, P. Delerive, A. Fadel, G. Chinetti, J. C. Fruchart, J. Najib, J. Macclouf and A. Tedgui, *Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators*, Nature, 393, 790-3, 1998.

- **Steegmaier M.**, A. Levinovitz, S. Isenmann, E. Borges, M. Lenter, H. P. Kocher, B. Kleuser and D. Vestweber, *The E-selectin-ligand ESL-1 is a variant of a receptor for fibroblast growth factor*, Nature, 373, 615-20, 1995.

- **Steinberg D.**, S. Parthasarathy, T. E. Carew, J. C. Khoo and J. L. Witztum, *Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity*, N Engl J Med, 320, 915-24, 1989.

- **Sternby** N. H., J. E. Fernandez-Britto and P. Nordet, *Pathobiological determinants of atherosclerosis in youth (PBDAY Study)*, 1986-96, Bull World Health Organ, 77, 250-7, 1999.

- **Strieter** R. M., A. E. Koch, V. B. Antony, R. B. Fick, Jr., T. J. Standiford and S. L. Kunkel, *The immunopathology of chemotactic cytokines: the role of interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1*, J Lab Clin Med, 123, 183-97, 1994.

- **Strieter** R. M., S. L. Kunkel, V. M. Elner, C. L. Martonyi, A. E. Koch, P. J. Polverini and S. G. Elner, *Interleukin-8. A corneal factor that induces neovascularization*, Am J Pathol, 141, 1279-84, 1992.

- **Suzuki** T., S. Hashimoto, N. Toyoda, S. Nagai, N. Yamazaki, H. Y. Dong, J. Sakai, T. Yamashita, T. Nukiwa and K. Matsushima, *Comprehensive gene expression profile of LPS-stimulated human monocytes by SAGE*, Blood, 96, 2584-91, 2000.

- **Tsuchiya** S., M. Yamabe, Y. Yamaguchi, Y. Kobayashi, T. Konno and K. Tada, *Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1)*, Int J Cancer, 26, 171-6, 1980.

- **Turpin** G., F. Colomes, L. G. Paillard, E. Bruckert and P. Fossati, *L'exploration du métabolisme lipidique en pratique courante*, COMITÉ FRANÇAIS DE COORDINATION DES RECHERCHES SUR L'ATHÉROSCLÉROSE ET LE CHOLESTÉROL, 1995.

- **Voet** D. and J. G. Voet, *Biochimie*, De Boeck Université, 1, 1362, 1998.

- **von Andrian** U. H., S. R. Hasslen, R. D. Nelson, S. L. Erlandsen and E. C. Butcher, *A central role for microvillous receptor presentation in leukocyte adhesion under flow*, Cell, 82, 989-99, 1995.

- Wang G. and K. O., *Homocysteine stimulates the expression of monocyte chemoattractant protein-1 receptor (CCR2) in human monocytes: possible involvement of oxygen free radicals*, Biochem J, 357, 233-40, 2001.
- Weber C., G. Draude, K. S. Weber, J. Wubert, R. L. Lorenz and P. C. Weber, *Downregulation by tumor necrosis factor-alpha of monocyte CCR2 expression and monocyte chemotactic protein-1-induced transendothelial migration is antagonized by oxidized low-density lipoprotein: a potential mechanism of monocyte retention in atherosclerotic lesions*, Atherosclerosis, 145, 115-23, 1999.
- World Health Organization, *Prevention of coronary heart disease*, World Health Organ Tech Rep Ser, 678, 1-53, 1982.
- Yamada Y., T. Doi, T. Hamakubo and T. Kodama, *Scavenger receptor family proteins: roles for atherosclerosis, host defence and disorders of the central nervous system*, Cell Mol Life Sci, 54, 628-40, 1998.